

Leiden

1935

- I Een hypothese over het mechanisme van de
(phobo-) chemotaxis
- II De carotenoïden, steroïden en vetzuren van
Polytoma uvella

STANFORD LANE MEDICAL
LIBRARY SAN FRANCISCO

J. LINKS

I Een hypothese over het mechanisme van de
(phobo-) chemotaxis

II De carotenoïden, steroïden en vetzuren van
Polytoma uvella

Een hypothese over het mechanisme van de
(phobo-) chemotaxis

De carotenoiden, steroïden en vetzuren van
Polytoma uvella

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN
DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE
AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS
DR A. E. VAN ARKEL, HOOGLERAAR IN DE
FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE

PUBLIEK TE VERDEDIGEN OP
WOENSDAG 14 DECEMBER 1955
TE 16 UUR

DOOR

JAN LINKS

GEBOREN TE HELMOND IN 1922

Promotor: Prof. Dr E. Havinga

Aan hen die mij dierbaar zijn

INHOUD

Hoofdstuk I. Theoretisch onderzoek naar factoren, die algemeen bij chemotaxis optreden	9
1 Inleiding	9
1.1 Tactische bewegingen	9
1.2 Kinetische neven-effecten	10
1.3 Chemotaxis	10
2 Beperking van het onderzoek tot de phobo-chemotaxis	12
2.1 Overzicht	12
2.2 De definities van topo-taxis en phobo-chemotaxis	12
2.3 Het voorkomen van phobo-, topo- en pseudo-topo- chemotaxis	13
3 De gemeenschappelijke factor	15
3.1 Een hypothese voor de phobo-chemotaxis	15
3.2 Een andere formulering van de hypothese	16
3.3 De energieleverende stof van het bewegings- apparaat	16
3.4 Opmerkingen over osmo-, thermo- en phototaxis	17
4 Chemotaxis door verschillende stoffen	18
4.1 Chemotaxis door zuurstof	18
4.2 Chemotaxis door substraatstoffen	18
4.3 Chemotaxis door K-ionen	19
4.4 Chemotaxis door de overige alkali-ionen	20
4.5 Chemotaxis door de tweewaardige metaalionen	21
4.6 Chemotaxis door de driewaardige metaalionen	21
4.7 Chemotaxis door fosphaat-ionen	22
4.8 Chemotaxis door narcotica	22
4.9 Opheffing van de chemotaxis door een bepaalde stof met behulp van narcotica	23
5 Vroegere onderzoeken naar het inwendige mecha- nisme van de phobo-chemotaxis	24
6 Enkele recente chemotaxis-onderzoeken (vgl. 8. 10)	25
7 Samenvatting	26
8 Appendix	27
8.1 Positieve en negatieve topo (of phobo) chemotaxis	27
8.2 Opmerkingen bij de vroeger algemeen aangenomen topo-chemotaxis	27
8.3 Voorbeeld van een phobochemotactische ophoping	28
8.4 De pseudo-topo-phototaxis	29
8.5 De pseudo-topo-chemotaxis	29
8.6 De chemotactische „sensibiliteiten“	30
8.7 Verband tussen de snelheid van bewegen en de ge- voeligheid van de chemotactische reactie	31
8.8 Verband tussen de phototaxis en de fotosynthese	31
8.9 De invloed van K^+ , Ca^{++} enz. op de structuur van de bicolloïden	32
8.10 De hypothese van Clayton	33
9 Literatuur	35

Hoofdstuk II. Onderzoek naar de mogelijkheid om de chemotaxis-hypothese te bewijzen	39
1 Inleiding	39
2 Materiaal en methoden	40
2.1 Techniek van het chemotaxis-onderzoek	40
2.2 Techniek van de respiratie-metingen	40
2.2 De Polytome uvella stam	41
2.4 Chemicaliën	41
3 Resultaten en discussie	43
3.1 Chemotaxis en respiatiemetingen	43
3.1.1 Enige verzadigde aliphatische carbonzuren	43
3.1.2 Methanol, aethanol en propanol	43
3.1.3 De K-zouten van di-n-amylazijnzuur en α -naphthylazijnzuur	43
3.1.4 Enkele andere stoffen	44
3.1.5 Discussie	45
3.2 De chemotaxis-proeven van Pringsheim en Mainx (1926)	45
3.3 Een „verduunningseffect" bij Polytoma uvella	47
3.4 Theoretische beperkingen van de tweede hypothese	48
3.5 Beperkingen van de mogelijkheden van het Warburg-apparaat voor ons onderzoek	48
3.6 Algemene opmerkingen	49
4 Samenvatting	50
5 Literatuur	51
Hoofdstuk III. De nadelige invloed van schudden op de respiratie van Polytome uvella en een hypothese over de thigmotaxis van protisten	53
1 Inleiding	53
2 Discussie	54
2.1 Algemeen gedeelte	54
2.2 De phobo-thigmotaxis	54
2.3 De topo-thigmotaxis	55
3 Samenvatting	55
4 Literatuur	56
Hoofdstuk IV. Het verkrijgen van goed bewegende Polytoma's in een medium zonder C- en (of) N-bron	57
1 Inleiding	57
2 Experimentele gegevens	58
2.1 Het overbrengen met behulp van filtratie	58
2.2 Het overbrengen met behulp van de aerotaxis	58
2.3 Het overbrengen met behulp van centrifugeren	59
2.4 Verdere waarnemingen bij de centrifuge-proeven	60
3 Discussie	61

4 Samenvatting	62
5 Literatuur	62
Hoofdstuk V. Isolering van de lipoiden uit Polytoma	
uvella en onderzoek van de daarin aanwe-	
zige carotenoiden	63
1 Inleiding	63
2 Experimentele gegevens	65
2.1 Het kweken van Polytoma uvella	65
2.2 Isolering en scheiding van de carotenoiden, ste-	
roiden en vetzuren	66
2.2.1 Isolering van de lipoiden en afscheiding van	
de vetzuren	66
2.2.2 Scheiding van de onverzeepbare fractie in	
carotenoiden en steroiden	66
2.3 Vooronderzoek bij de scheiding van het carote-	
noiden-mengsel	67
2.4 Scheiding en karakterisering van de carotenoiden	72
2.4.1 De epiphasische carotenoiden (E. P.)	72
2.4.2 De gele fractie van de epiphasische carotenoiden (E. P. G.)	73
2.4.3 Kleurstof A (een isomeer van β -caroteen)	73
2.4.4 Kleurstof B (β -caroteen)	74
2.4.5 De rode fractie van de epiphasische carotenoiden (E. P. R.)	75
2.4.6 Kleurstof D	77
2.4.7 Kleurstof J	77
2.4.8 De overige E. P. R. carotenoiden	80
2.4.9 De hypophasische carotenoiden (H. P.)	80
2.4.10 Kleurstof H. P. 4	81
2.4.11 De overige H. P. carotenoiden	82
2.5 Fluorescerende componenten in de oorspronkelijke onverzeepbare lipoid-fractie	82
2.6 De isolering van enkele carotenoiden uit Cantharellus Cinnabarinus	83
2.6.1 De E. P. carotenoiden van Cantharellus C.	83
2.6.2 De H. P. carotenoiden van Cantharellus C.	84
3 Materialen en methoden	85
4 Discussie	87
4.1 De scheiding van carotenoiden en steroiden	87
4.2 Hoeveelheden van de carotenoiden in Polytoma uvella	88
4.3 De structuur van de carotenoiden in Polytoma uvella	90
4.3.1 Kleurstof D	91
4.3.2 Kleurstof J (polytomaxanthine)	92
4.3.3 HP 4 en de overige pigmenten	93
4.4 Resultaten met de controle-serie 2b	94

4.5	Vergelijking van de carotenoiden in <i>Polytoma uvella</i> met die van de carotenoiden in verschillende algen	95
4.6	De carotenogenese bij <i>Polytoma uvella</i>	95
5	Samenvatting	97
6	Literatuur	99
Hoofdstuk VI. De steroiden van <i>Polytoma uvella</i>		117
1	Inleiding	117
2	Materiaal en methoden	117
3	Experimentele gegevens	117
3.1	Isolering van de steroiden	118
3.2	U. V. absorptie-spectra	119
3.3	Bepaling van het gehalte aan provitamine-D-achtig steroid	120
3.4	Papierchromatografisch onderzoek	121
3.5	Infrarood absorptiespectra en verdere experimentele gegevens	123
4	Samenvatting	124
5	Literatuur	124
Hoofdstuk VII. De hogere vetzuren van <i>Polytoma uvella</i>		128
1	Inleiding	128
2	Methoden	128
3	Experimentele bijzonderheden en resultaten	128
3.1	Bepaling van de diënzuren en de polyënzuren	130
3.2	Bepaling van het mono-ëenzuur („oliezuur“)	130
3.3	Bepaling van de verzadigde vetzuren	131
4	Discussie	131
5	Samenvatting	132
6	Literatuur	132
Hoofdstuk VIII. Groeiproeven met <i>Polytoma uvella</i> op synthetische media		135
1	Inleiding	135
1.1	De voeding van <i>Polytoma uvella</i>	135
1.2	Aanleiding en beperking van de eigen groeiproeven	136
1.3	De concentratie van de spore-elementen	137
1.4	Vitamine B ₁ als mogelijke groeifactor	138
1.5	Vitamine B ₁₂ als mogelijke groeifactor	138
2	Materiaal en methoden	139
2.1	Kweektechniek	139
2.2	Chemicaliën en polarographisch onderzoek	139
2.3	Microbiologische vitamine B ₁₂ -bepaling	140
3	Resultaten en discussie	140
3.1	De invloed van de spore-elementen-concentratie	140
3.2	De invloed van vitamine B ₁	141

Hoofdstuk I

THEORETISCH ONDERZOEK NAAR FACTOREN, DIE ALGEMEEN BIJ CHEMOTAXIS OPTREDEN

1. Inleiding

In dit hoofdstuk wordt getracht om met behulp van de verspreide literatuurgegevens te komen tot factoren, die in alle gevallen van chemotaxis gelijk zijn.

1. 1. *Tactische bewegingen*

Onder een taxis verstaat men in de biologie de gerichte locomotorische beweging van een organisme onder de invloed van een uitwendige „prikkel“ *). In de microbiologie en het plantenrijk zijn we dan door de restrictie „locomotorische“ beperkt tot de bewegende micro-organismen, de zwermstadia van hoger ontwikkelde algen en schimmels, de spermatozoiden van mossen, varens en Cycadeae; in het algemeen eencellige organismen met ciliën of flagellen.

In het dierenrijk beperkt men zich met de naam taxis in het algemeen tot meer primitieve oriëntatie-reacties, zoals men die vindt bij de invertebraten en „lagere“ vertebraten, waar men het leerproces, dus voorafgaande training of ervaring uitgesloten mag achten (2).

Waar men bij dieren weer zeer verschillende taxes kan hebben ten gevolge van de grote verscheidenheid in morphologie en physiologie (telotaxis, tropotaxis, klinotaxis en de verwante „transverse orientations“) beperken wij ons met onze beschouwingen tot die vertegenwoordigers van het dierenrijk, die het meest bij de hierboven genoemde eencelligen aansluiten, nl. de protozoa en de spermatozoiden van de metazoa. Protozoa, die zich waarschijnlijk met ciliën op het grensvlak vast substraat-lucht kunnen voortbewegen, zullen niet beschouwd worden. Ook uitgesloten worden de eencelligen, die zich voortbewegen zonder de hulp van flagellen of ciliën (My-

*) Een locomotorische beweging is een beweging, waarbij het hele organisme naar een andere plaats kan bewegen; dit in tegenstelling met bijv. de krommingsbewegingen van hogere planten.

xophyceae, Bacillariophyceae, Desmidiaceae, Beggiatoaceae, Myxomycetes en Sarcodinae).

Het medium, waarin de beschouwde organismen zich bewegen, is water, resp. een oplossing in water.

Al naar gelang de aard van de uitwendige prikkel onderscheidt men nu chemotaxis, phototaxis, osmotaxis en thermotaxis. We willen er hier reeds op wijzen, dat volgens de later te verdedigen hypothese in al deze gevallen een zelfde effect in het organisme optreedt. Galvanotaxis valt buiten deze studie, evenals de geotaxis en de ook wel in de literatuur genoemde rheotaxis.

1. 2. Kinetische neven-effecten

Naast de taxes, die dus gerichte reacties zouden zijn, namen reeds vroeg in de geschiedenis van de chemotaxis kinetische neven-effecten waar. Bijv. *Bacterium termo* en *Spirillum undula* worden chemotactisch „aangelokt” door vleesextract, maar er ook in hun beweging door versneld (Pfeffer 1884 (4)). Volgens Patten en Fraenkel en Gunn is dit een orthokinetisch effect *). De waarnemingen zijn niet talrijk, daar het volgen van de baan van individuele, vaak snelle en kleine organismen, zonder de hulpmiddelen van nu (film!) moeilijk, zo niet in vele gevallen onmogelijk was. Voor de verhoogde snelheid van varespermatozoiden in het archegonium, of bij de capillair in de Pfefferse opstelling wijzen we naar de literatuur (62, 63, 73, 74). Verwarring van chemotaxis met orthokinetische effecten is bij uitgesproken phobochemotaxis (vgl. § 3. 3) uitgesloten.

1. 3. Chemotaxis

De naam chemotaxis stamt van Pfeffer (3), die als tweede het verschijnsel bestudeerde. Aerotaxis, d.i. chemotaxis door zuurstof werd nl. reeds aangetoond door Engelmann in 1881 (1). Onder chemotaxis verstond men oorspronkelijk de gerichte beweging van eencelligen naar een plaatselijk hogere (of lagere) concentratie van een opgeloste stof (Pfeffer (3, 4, 12)). Men sprak van positieve en negatieve chemotaxis. Verderop wordt uitvoeriger beschreven, dat een gerichte beweging onder invloed van chemische prikkels meestal niet echt bleek te bestaan. Wij probeerden echter een correlatie te vinden voor de gevallen, die men nog steeds chemotaxis noemt en waarmee men in werkelijkheid een ophoping bij een plaatselijk

*) Een ortho-kinesis is een beweging, waarbij de snelheid van de voortwaartse beweging afhankelijk is van de intensiteit van de "prikkel". (Patten (115); Fraenkel en Gunn (2)).

andere concentratie van een „chemotaxis“ verwekkende stof bedoelt, zonder dat de organismen er met een gerichte beweging gekomen zijn. Dit wordt bij de bespreking van de phobo-chemotaxis toegelicht (§ 2.2.). Wij zullen een gemeenschappelijke factor in de ketenprocessen, die bij de verschillende gevallen van phobo-chemotaxis (ook phototaxis, osmotaxis en thermotaxis) optreden, trachten aan te tonen.

Meer dan één gemeenschappelijke factor is nog niet aantrekkelijk te maken, daar de verschillende micro-organismen, die chemotactisch kunnen reageren, te veel in morfologie en physiologie verschillen, terwijl het spectrum van chemotactica van geval tot geval weer anders is. Verder stuit het vraagstuk van de oplossing van alle fasen van de chemotaxis bij één bepaald organisme bijv. nog op de onvolledigheid van de, hier waarschijnlijk vereiste kennis van de spierchemie (en zenuwchemie?). Ook van de morfologie en physiologie der bewegingsorganellen van de beschouwde organismen, is vaak nog slechts weinig bekend (vgl. echter (117) → (121)).

We wijzen er nadrukkelijk op, dat, wil men van chemotaxis spreken, de organismen ook in de ophopingszone goed beweeglijk moeten blijven.

De techniek, waarmee de chemotaxis gewoonlijk wordt bestudeerd is afkomstig van Pfeffer *) (3, 4). Deze techniek komt hierop neer, dat men een druppel suspensie van goed bewegende eencelligen (varen-spermatozoiden of bacteriën, enz.) tussen een objectglaasje en een eenzijdig ondersteund dekglasje brengt. Een fijne capillair, gevuld met een oplossing van een geschikt chemotacticum en aan één zijde afgesloten (met vaseline of dichtgesmolten), wordt met de open zijde vooruit tot ongeveer het midden van de suspensie geschoven. Met een matige vergroting wordt de omgeving van de capillairmond dadelijk bekeken. Als bijv. een capillair met een verdunde appelzuuroplossing (in leidingwater) in een suspensie van goed bewegende spermatozoiden van de varen *Adiantum cuneatum* (in leidingwater) gebracht wordt, is het resultaat, dat de organismen zich in ongeveer een halve minuut bij de capillairmond ophopen, waarbij ze actief in beweging blijven. Voor een uitstekende variatie op deze techniek vergelijk men Kusano (14) en voor een algemeen overzicht van technieken Pringsheim (87). Bij dichte suspensies is het resultaat ook macroscopisch waar te nemen.

*) Pfeffer ontwierp deze techniek om de, toen nog slechts hypothetische chemische „aanlokking“ van de spermatozoiden door het archegonium bij varens en mossen te bevestigen (Vgl. echter (74)).

2. Beperking van het onderzoek tot de phobo-chemotaxis

2. 1. Overzicht

Waar de meeste gevallen van chemotaxis tot de zogenaamde phobo-chemotaxis behoren, zullen we ons voorlopig hiertoe beperken. Om dit begrip toe te lichten, zullen we achtereenvolgens beschouwen de definities voor topo-, en phobo-chemotaxis (en de definitie van de pseudotopo- photo-taxis *)). Hierna zullen we in het kort de stand van onze kennis omtrent de kwestie topo- en/of phobo-chemotaxis uiteenzetten.

2. 2. Definities van topotaxis en phobotaxis

De namen topo-chemotaxis en phobo-chemotaxis werden in 1904 door Pfeffer (12) geïntroduceerd, maar de begrippen bestonden al bij de aanvang van het chemotaxis-onderzoek door Pfeffer in 1884 (4). In onze hierna volgende beschouwing zullen we deze namen ook bij de bespreking van publicaties van voor 1904 gebruiken **).

Onder topotaxis verstaat men het verschijnsel, waarbij een vrij bewegende protist zich onder invloed van een „prikkel” actief beweegt in een richting naar de „prikkelbron” toe (of er van af). Zo onderscheidt men topo-chemotaxis, topo-phototaxis enz. De lichaamsas moet zich hierbij instellen bijv. in de richting van lichtstralen, of van een concentratiegradiënt van de opgeloste stof (12). Volgens Pfeffer is de reactie in het geval van een chemische „prikkel” (dus topo-chemotaxis) te danken aan een „verschillende beïnvloeding van de flanken”, overeenkomstig de tropismen van de (hogere) planten, zodat het lichaam bijdraait en het verschil wegvalt (pag. 475 en 477 (4)). Dit is een verklaring, die meer op analogie-redenering gebaseerd was dan op waarnemingen.

Onder phobotaxis verstaat men het verschijnsel, waarbij een vrijbewegende protist opgehoopt of afgestoten wordt door middel van „schrikreacties” (shock reactions; motorreflexes; schreckreaktionen) (12). Zodra de protist de „prikkel” ontvangt, maakt hij een complex van bewegingen, die alleen door de bouw van de protist bepaald worden. Een richting van het als prikkel werkende agens is voor de verandering van beweging niet belangrijk.

*) Voor de pseudo-topo-photo-taxis vergelijk men appendix 4.

**) De eerder door Rotherth voorgestelde namen, strophische, of tropische voor de topo-chemotaxis en apobatische chemotaxis voor de phobo-chemotaxis hielden geen stand (8).

We gaan nu iets dieper op de beide definities in om het verschil nader aan te geven tussen topotaxis en phobotaxis (vgl. appendix 1). Bij een topotaxis treedt het begin van de beweging naar een „doel” in, zodra het agens als „prikkel” gaat werken; de beweging duurt tot het „optimum”, het „doel” of een barriere (bijv. een glaswand bij topo-photo-taxis) bereikt is. In het geval van een chemische „prikkel” wordt bijv. bij positieve topo-chemotaxis in een Pfefferse opstelling het organisme bij het geraken in de „diffusiegradiënt” min of meer gericht naar de capillairmond (vgl. appendix 2).

Bij phobotaxis wordt geen bepaalde richting t. o. v. de „prikkelrichting” ingenomen. In het geval van een chemische „prikkel” wordt, bijv. bij positieve phobo-chemotaxis in een Pfefferse opstelling, het organisme bij het bereiken van de grens tussen de druppel en de „chemische val” (die uit de capillair, gevuld met chemotacticum-oplossing, gestroomd is) op generlei wijze gericht *). De beweging wordt in dezelfde richting voortgezet. Pas bij het verlaten van de „chemische val”, preciezer: als de grens tussen „chemische val” en druppel juist overschreden is, treedt een „schrikreactie” op; het organisme gaat met een min of meer gecompliceerde reeks van bewegingen (meestal) terug in de „chemische val”. (voor een voorbeeld zie appendix 3). De plaats, waar het organisme na „teruggeschrokken” te zijn, gekomen is, is onafhankelijk van de richting van de oorspronkelijk voorwaartse beweging, die hem uit de chemische val voerde, ten opzichte van bijv. de „grenslijn” (of de „diffusiegradiënt”).

2. 3. *Het voorkomen van phobo-, topo- en pseudo-topochemotaxis*

Overzien we de onderzoeken, waarin men zich bezighield met de vraag of men het topo- en/of phobo-chemotaxis te maken had, dan komen we tot de volgende conclusies:

1. Phobo-chemotaxis is sinds 1897 vastgesteld voor verscheidene organismen, waaronder ciliaten zoals *Paramecium* (10), flagellaten zoals *Chilomonas paramecium* en *Euglena* (Jennings (10)), bacteriën (Rothert (8), Jennings (10), Reichert (75), Ulehla (76), zwermsporen van myxomyceten (Kusano (14)), zwermsporen van hogere algen (Ulehla (76), en enkele eenvoudige varen- en mosspermatozoiden, zoals die van *Marchantia polymorpha* (Ulehla (76)). Verder kunnen genoemd worden de onder niet geheel te vergelijken omstandigheden door Hoyt gedane waarnemingen voor de spermatozoiden van de varen *Pteris multifida* (61). Voor een beschrijving van een phobo-chemotactische ophoping verwijzen we naar appendix 3.

*) Er kan wel een ortho-kinetisch effect optreden. Vergelijk § 1. 2. en § 3. 3.

2. Topo-chemotaxis is pas werkelijk aannemelijk gemaakt door Metzner in 1923 voor de ingewikkelde polyciliate spermatozoiden van de varen *Adiantum cuneatum*, die in de Pfefferse opstelling door appelzuur „aangelokt” worden (74).*) Bij deze spermatozoiden reageren waarschijnlijk inderdaad alleen de „geprikkelde flanken”. De reactie is een versnelde of vertraagde ciliënslag. Men kan zeggen, dat hier de afzonderlijke flanken ortho-kinetisch reageren (vgl. voetnoot § 1.2.). Als het voortbewegende en roterende organisme met één zijde de „chemische val” raakt, worden de ciliën aan die zijde versneld. De rotatie (het spiraalvormige lichaam roteert passief door de trekkende werking van de op de spiraal ingeplante, ciliën en zijn bijzondere vorm) en de tijd nodig om na de aanraking de ciliën sneller te doen slaan, werken dan samen om het lichaam in de „chemische val” te brengen. Voert de baan van het organisme loodrecht op de grens van de „chemische val” en het buiten-medium, dan heeft er geen afbuiging plaats noch bij het binnengaan, noch bij het verlaten van de „chemische val”. In het laatste geval ontsnapt het organisme dus. Op de grens wordt de beweging alleen langzamer. Bij scheef aankomen op de grens buigt de baan, die het organisme uit de val dreigde te voeren, wel meestal terug.

Eenvoudiger varen- en mosspermatozoiden, zoals bijv. die van *Chara foetida* en *Preissia commutata* met twee flagellen aan de kop, zullen vrij zeker phobo-chemotactisch reageren. Van de meeste, meer ingewikkelde varen- en mosspermatozoiden staat nog niet vast hoe zij reageren.

3. Lidforss (21) en Shibata (63, 79) vermeldten in 1905 het gelijktijdig aanwezig zijn van topo- en phobo-chemotaxis bij varenspermatozoiden. De organismen zouden topo-chemotactisch naar de capillairmond toegestuurd worden en phobo-chemotactisch „terugschrikken”, als ze de omgeving van de capillairmond (de „chemische val”) dreigen te verlaten. Pfeffer overwoog deze mogelijkheid reeds in 1884, maar wees hem van de hand **).

Dank zij Metzner's onderzoek kunnen we ons theoretisch de mogelijkheid van het ogenschijnlijk gelijktijdig aanwezig zijn van topo- en phobo-chemotaxis voorstellen bij ingewikkelde organismen (bijv. weer polyciliate varenspermatozoiden), waarbij de „flanken” onafhankelijk kunnen reageren met een snellere ciliënslag bij verhoging van de chemotacticum-

*) Pfeffer had reeds eerder voor de varen- en mosspermatozoiden topotaxis aangenomen, echter op grond van minder gedetailleerde waarnemingen (3, 4). Zie ook Voegler (62), Buller (77), Rothert (8) en Akermann (78). Pfeffer was aanvankelijk zo overtuigd van het uitsluitend bestaan van de topo-chemotaxis, dat hij ook voor de, afzonderlijk meestal nog moeilijker te volgen bacteriën en flagellaten topo-chemotaxis aannam, welke mening later gecorrigeerd moest worden.

**) Ten gunste van het uitsluitend voorkomen van topotaxis (vgl. eerste voetnoot).

concentratie (bijv. appelzuur) en met een omkering van de ciliënslag bij verlaging van die concentratie (omkering i. p. v. vertraging) *).

Bij het verlaten van de ophopingszone, waarnaar het organisme eerst topo-chemotactischtoegestuurd werd, zullen als de baan min of meer loodrecht de zones van afnemende concentraties voert, "alle ciliën geprikkeld worden" en zal het organisme een "secundaire schrikreactie" uitvoeren (Metzner (74)). Bij een minder loodrechte baan wordt het organisme afgebogen (pag. 462 en 493 van (74)). Krachtens de definities blijven wij het echter een topo-chemotaxis noemen.

Wij menen, dat Pfeffer gelijk had met het afwijzen van een gelijktijdig aanwezig zijn van topo- en phobo-chemotaxis *)

4. Voor een bespreking van het door Pringsheim in 1912 gesuggereerde bestaan van pseudo-topo-chemotaxis, analoog aan de pseudo-topo-phototaxis verwijzen we naar appendix 5.

3. De gemeenschappelijke factor

3. 1. Een hypothese voor de phobo-chemotaxis

Wij vingen ons onderzoek aan met het zoeken naar correlaties tussen de eigenschappen van stoffen, die voor het één of ander organisme chemotactica bleken te kunnen zijn en hun mogelijk effect op (in) de cel. Phototaxis en osmotaxis werden ook in het onderzoek betrokken. Chemotactica bleken te kunnen zijn allerlei stoffen, die we zouden kunnen omschrijven als voedingsstoffen, zuurstof, metabolische tussenproducten, narcotica, oppervlakactieve stoffen, organische en anorganische kat- en anionen, saccharose, alkanen, alcoholen, heterocyclische verbindingen, enz.

De cel kan op velerlei wijzen beïnvloed worden; we noemen slechts enkele aangrijpingspunten zoals de permeabiliteit, het metabolisme in het algemeen, bepaalde enzymsystemen, het "spiermechanisme" van de fibrillen en ciliën, enz.

Wij kwamen tot de volgende conclusie 1) en hypothese 2).

1. *Er valt niet een of een klein aantal bepaalde, directe aangrijpingspunt(en) voor chemotactica aan te wijzen, dat in alle chemotactisch reagerende protisten hetzelfde is (vgl. appendix 6).*

2. *De eerste/enige gemeenschappelijke factor van de ketenprocessen, die in verschillende gevallen van phobo-chemotaxis (of phobo-phototaxis, phobo-osmotaxis, enz.) bij de eigenlijke schrikreactie optreden, is de plotselinge (zeer snelle) verlaging van het energieverbruik (energietoevoer) in het bewegingsapparaat van de reagerende protist.*

*) Men zou wel kunnen zeggen, dat bij dit (hypothetische) topochemotactische organisme de "onafhankelijk reagerende flanken" op zich zelf phobo-chemotactisch reageren (vgl. § 2.2.).

We zijn er ons van bewust, dat de hypothese door zijn beperking tot een algemeen voorkomende, fundamentele factor vele chemotaxis-verschijnselen moet kunnen beschrijven. We menen echter, dat dit bij de huidige stand van zaken gemotiveerd is, temeer daar de hypothese tot nadere experimentele toetsing aanspoort (vgl. § 8.6. en hoofdstuk II).

3. 2. Een andere formulering van de hypothese

Bij het komen in de „chemische val” wordt de door het voortbewegingsmechanisme per tijdseenheid beschikbare hoeveelheid brandstof zeer waarschijnlijk altijd eerst verhoogd, hetgeen soms waargenomen werd als een hogere snelheid van het organisme. Meestal kon dit niet gemakkelijk waargenomen worden door de relatief hoge snelheid van de organismen. De zwermspore van *Fuligo varians* legt bijv. 1 mm/sec, dat is $60 \times$ zijn eigen lichaamslengte per sec, af (vgl. appendix 7).

Op zichzelf zou dit „ortho-kinetische” effect, indien aanwezig, tot een vermindering van het aantal organismen bij de capillairmond leiden. Bij insecten, zoals *Porcellio scaber* is zoiets wel bekend, maar voor zover wij weten, niet bij protisten (Vgl. pag. 11 van (2)).

Bij het verlaten van de „chemische val” daalt de concentratie van het chemotacticum bij het aangrijpingspunt in (?) het organisme klaarblijkelijk snel genoeg om de schrikreactie, waarbij dus volgens onze hypothese plotseling de energietoevoer in het bewegings-apparaat daalt, te veroorzaken. We moeten bedenken, dat de door een molecuul chemotacticum maximaal af te leggen weg, om van buiten naar het aangrijpingspunt in de cel te komen, van de grootte-orde van enkele μ 's is (Vgl. (64)).

Wij zouden onze hypothese dus ook zo kunnen stellen:

Iedere stof, die plotseling en reversibel de brandstoftoevoer (of het verbruik er van (in het bewegings-apparaat) verhoogen kan, kan een phobotactisch organisme in de Pfefferse opstelling „aanlokken”.

3. 3. De energieleverende stof van het bewegingsapparaat

Essentiëel bij de eigenlijke schrikreactie is dus volgens onze hypothese, de plotselinge verlaging van de toevoer of het verbruik van de energieleverende stof in het bewegings-apparaat. Deze stof is waarschijnlijk adenosine-trifosphaat (A.T.P.). Uit enkele publicaties blijkt nl., dat A.T.P. de energiebron kan zijn bij de contractie van de (geïsoleerde) flagellen van dierlijke spermatozoiden (80), trypanosomen (81) en bacteriën (82b). Verder bleek, dat A.T.P. gebracht in het

medium van *Proteus vulgaris* (82a) de bewegingssnelheid ver-groot.

Wij zullen in het vervolg over A. T. P. spreken als de ener-gieleverende stof of de brandstof van het bewegings-apparaat, maar wij zijn ons bewust van de mogelijk te grote beperktheid van deze uitspraak *).

Waarschijnlijk gaat minder dan 1% van alle geproduceerde A. T. P. naar het bewegings-apparaat. Vgl. pag. 42 van (60) en (89).

3. 4. *Opmerkingen over osmotaxis, thermotaxis en phototaxis*

Een stof kan tot een taxis aanleiding geven door zijn speci-fieke structuur (bijv. fumaarzuur is wel en maleinezuur is geen chemotacticum voor *Isoëtes*-spermatozoiden (63)), of door niet-specifieke eigenschappen van die stof, zoals het vermogen een osmotische druk te veroorzaken (pag. 283 (4); pag. 294 (6a)). In het eerste geval spreekt men van chemotaxis en in het laatste geval van osmotaxis. Ook veranderingen van de temperatuur en de belichting bij fotosynthetiserende, of door kleurstoffen gephotosensibiliseerde organismen (vgl. pag. 125 (60)) zullen plotseling de voor het voortbewegingsmecha-nisme per tijdseenheid beschikbare hoeveelheid brandstof kun-nen veranderen. Voor een voorbeeld van thermotaxis zie men bijv. (60), voor osmotaxis (6a) en voor phototaxis pag. 186 van (6a) en (10, 90, 91).

Wij vatten vanuit onze hypothese deze taxis-verschijnselen dus samen (geo- en galvanotaxis vallen buiten deze studie) en menen, dat bijv. phobo-phototaxis en phobo-chemotaxis bij *Euglena viridis* niet sterker verschillen dan phobo-chemo-taxis door acetaation en phobo-chemotaxis door aethanol bij *Polytoma uvella*. Men zou ook kunnen zeggen, als we niet de cel plus bewegings-apparaat, maar alleen het bewegings-appa-raat van de flagellen beschouwen, dat er alleen maar een che-motaxis door A. T. P. bestaat.

Voor het verband tussen phototaxis en photosynthese zie appendix 8.

*) Voor spierfibrillen werd reeds eerder aangenomen, dat A. T. P. de meest directe energieleverancier was (44), al is het beeld hier niet zo duidelijk, als soms gesuggereerd werd. Recente proeven met spier-preparaten van kikkers en schildpadden, die electrisch i.p.v. chemisch geprikkeld werden, wijzen op andere vormen van energierijke brand-stof dan A. T. P. of creatinephosphaat, waarmee A. T. P. weer opge-bouwd kan worden (84, 85). Er zijn ook betrekkelijk recente sugges-ties, dat co-enzym-A, of de gereduceerde vorm van T. P. N. (triphos-pho-pyridine-nucleotide) de rol van een „high energy phosphate”, zoals A. T. P. over kan nemen (17).

De onlangs door Hoffmann-Berling geuite bewering, dat A. T. P. de directe energiebron voor alle bewegingen in levende systemen zou zijn, moet dan ook met reserve behandeld worden (81).

4. Chemotaxis door verschillende stoffen

4. 1. Chemotaxis door zuurstof

De oudst bekende chemotaxis, nl. door O_2 , ook wel speciaal aero-taxis genoemd, komt zeer algemeen voor (1, 6, 8, 10, 19, 20, 21). Het is bekend, dat als O_2 een beperkende factor wordt, de aerobe organismen een lager metabolisme hebben (64) met als gevolg dus een lagere A. T. P. -productie. Komt het organisme nu in een hogere O_2 - concentratie, dan zal de A. T. P. -productie toenemen.

Vaak ziet men als nevenverschijnsel juist bij aerotaxis een orthokinetisch effect; aan de rand van de druppel onder het dekglasje zijn de micro-organismen goed beweeglijk en hopen zich op, terwijl ze in het midden voor zover er daar nog enkele zijn, snel onbeweeglijk worden, waarschijnlijk hoofdzakelijk door O_2 -gebrek.

4. 2. Chemotaxis door substraatstoffen

Vele bacteriën en protozoën reageren chemotactisch op stoffen, die direct als voedingsstof kunnen dienen. In het licht van het voorgaande is dit begrijpelijk, als aangenomen mag worden, dat de stof snel voor energielevering gebruikt kan worden. Interessant zijn nu juist enkele uitzonderingen:

a. *Polytoma uvella*, een kleurloze *Chlamydomonas*-soort, die goed aethylacetaat als enig organisch substraat gebruiken kan indien NH_4^+ -ionen aanwezig zijn naast de gebruikelijke anorganische zouten, reageert niet chemotactisch op deze stof (Pringsheim (18); Pringsheim vond reeds eerder, dat dit organisme geen alcohol, maar wel goed acetaat-ion gebruiken kan als substraat. Acetaat-ion en alcohol zijn beide goede chemotactica voor *Polytoma uvella*.

Het is mogelijk, dat de noodzakelijke voorafgaande hydrolytische splitsing van het „onnatuurlijke“ aethylacetaat een te langzaam proces is. Ook een, niet te onwaarschijnlijke, mogelijkheid, is dat het aethylacetaat bij het steriliseren van de voedingsbodem en/of tijdens het kweken op het zwak alkalische milieu (kwestie van verscheidene dagen) gedeeltelijk gehydrolyseerd werd in Pringsheim's groei-experimenten.

b. Nog een uitzondering is bijv. het feit, dat glycerol, veelal een goede voedingsstof voor bacteriën, deze in het algemeen niet chemotactisch deed reageren (Pfeffer (4)).

Nu heeft Overton (65) reeds lang geleden regels opgesteld voor de penetratie van organische stoffen in plantaardige en dierlijke cellen. Glycerol bleek in het algemeen vaal langzamer te permeëren dan bijv. monohydrische alcoholen, zwakke organische zuren en koolwaterstoffen. Zonder hier te willen

ingaan op de verschillende theorieën voor de passieve en vrijwel nog onbegrepen actieve penetratie van cellen (zie bijv. 25, 103) kan hier toch een mogelijke verklaring worden gesuggereerd.

c. Overton vond verder, dat suikers (glucose, sucrose enz.) gemiddeld nog moeilijker permeëren. Nu werken inderdaad ook suikers vaak niet, of pas in hoge concentratie als chemotacticum voor bacteriën, terwijl deze organismen deze suikers wel goed als substraat kunnen gebruiken. Bij de spermatozoiden van Muscineae (bladmossen) is sucrose echter wel weer een goed chemotacticum (het enige) en dextrine met nog hoger mol gewicht is het voor *Bacterium termo* (4, 5).

In dit verband willen wij er ook nog op wijzen, dat hoogmoleculaire eiwitten zelfs als specifieke chemotactica voor de spermatozoiden van *Marchantia polymorpha* gevonden werden (21 *).

4. 3. Chemotaxis door K^+ -ionen *)

Pfeffer (5) en Kniep (51) vonden, dat K^+ -zouten haast universeel goede chemotactica zijn voor bacteriën. K-zouten zijn in dit opzicht veel beter dan die van Na, NH_4 , Li, Cs, Rb, Mg, Ca, Sr en Ba. Anderzijds weten we, dat K^+ in tegenstelling tot tweewaardige ionen in relatief grote concentraties aanwezig moet zijn voor een optimaal functioneren van vitale processen in de cel (22). Door de hoge aanwezige concentratie op bepaalde punten, bijv. aan de basis van de bewegingsorganellen (23), zal er voortdurend een verlies door diffusie naar buiten optreden, dat tegengewerkt wordt door een nog onbekend energieverbruikend pompsysteem (29, 30). Een hogere buiten-concentratie aan K^+ zal dus in vele gevallen (bijv. met bacteriën, die in een „chemische val” met een verdunde vleesextract-oplossing gezwommen zijn) gemakkelijker een optimale concentratie van K^+ op de verschillende punten van de cel doen onderhouden.

In de literatuur zijn verschillende voorbeelden aan te wijzen, waaruit blijkt, dat K^+ ionen vrijwel algemeen het metabolisme en (dus) ook de A. T. P.-productie van verschillende soorten weefsels verhogen kunnen (24, 39, 40). Voor afzonderlijke enzymen heeft men de noodzaak van K^+ -ion reeds aangetoond bijv. bij pyrodruivenzuurphosphopherase en fructokinase. Bij de meeste enzymen heeft men er nog niet speciaal naar gezocht in tegenstelling met het onderzoek naar de noodzakelijkheid van meerwaardige metaalionen.

Kijken we nu eens naar het voortbewegingsmechanisme als A. T. P.-motor. Voor het goed functioneren van de spier, van

*) Vergelijk appendix 9.

ciliën en flagellen heeft men de fundamentele rol van het K^+ -ion aangetoond.

Gray bewees de directe parallelliteit tussen K^+ -ionenconcentratie en de frequentie van de ciliënbeweging bij *Mytilus edulis* (28). Wat de spierchemie betreft, herinneren we aan:

- a. de noodzaak van een juiste verhouding tussen de concentraties van de K^+ -, Ca^{++} - en Mg^{++} ionen bij de contractie van vrije actomyosine-draden na toevoegen van A. T. P.
- b. de stimulering door K^+ - en Ca^{++} - ionen en de remming door Mg^{++} ionen van de A. T. P.-ase activiteit van myosine.
- c. de invloed van het K^+ -ion op het aantal gràmmen actomyosine, dat zich met 1 mol A. T. P. kan verbinden.

Voor details verwijzen we kortheidshalve naar de literatuur (44, 45, 46, 47).

Ondanks de nu nog te moeilijke opgave om de talrijke publicaties over de werking van de spier en de contractiele elementen in het algemeen tot een harmonisch sluitend geheel in elkaar te passen, kunnen we

1. de fundamentele rol, van K^+ -ionen bij het eigenlijke voortbewegingsmechanisme constateren.
2. concluderen, dat bij een sub-optimale concentratie aan K^+ -ionen de A. T. P.-motor minder dan de maximale hoeveelheid A. T. P. per tijdseenheid in bewegingsenergie kan omzetten.

Het verbruik van een eventueel steeds voldoende aanwezige hoeveelheid A. T. P. kan dus in de motor geregeld worden door verandering van de K^+ -ionenconcentratie in het medium. Van daar dat wij in de opgestelde hypothese onderscheiden, toevoer en verbruik van energieleverende stof (Vgl. § 3. 1. en § 3. 3.). Waarschijnlijk treedt hierbij een terugkoppeling op, zodat ook het metabolisme, o. a. merkbaar aan de respiratie, gestimuleerd wordt om aan de „toegenomen vraag” te kunnen voldoen.

Samenvattend kunnen we zeggen, dat het waarschijnlijk is

1. dat in vele gevallen van chemotaxis door K^+ -ionen het metabolisme en dus ook de A. T. P.-productie direct gestimuleerd wordt en dat
2. het A. T. P. sneller omgezet wordt in bewegingsenergie in de contractiele elementen, hetgeen op zijn beurt weer een stimulerende invloed op het metabolisme heeft.

De punten 1 en 2 zijn in werkelijkheid niet zo schematisch te scheiden.

4. 4. *Chemotaxis door de overige alkali-ionen*

Dat de andere alkali-metalen ook chemotactisch werken, maar minder dan kalium, is in het licht van de beschouwingen bij § 4. 3. begrijpelijk. K^+ kan tot een zekere graad bij verschillende weefsels met hun ingewikkelde enzymsystemen door

andere alkali-ionen vervangen worden en wel gemiddeld met dien verstande, dat $K^+ > Ru^+ > Cs^+ > Na^+ > Li^+$ werkzaam is (22, 24, 48).

4. 5. *Chemotaxis door de tweewaardige metaalionen* *)

De rol van Ca^{++} en Mg^{++} in het spiermechanisme en dus waarschijnlijk ook direct in het mechanisme van de ciliën en de flagellen werd reeds aangeduid. Anderzijds maakt de universele noodzakelijkheid van tweewaardige metaalionen voor de goede werking van talrijke bekende en zeer waarschijnlijk ook in de protisten aanwezige enzymen (vgl. 22, 52) begrijpelijk, dat zij plotseling het metabolisch proces kunnen beïnvloeden, als een protist toevallig in een hogere concentratie er van zwemt.

Evenals bij de alkali-ionen kunnen hier heel complexe verschijnselen optreden. Bijv. Mg^{++} remt A.T.P.-ase (46), maar stimuleert de kinases, phosphophorases en mutases. Voor de meervoudige rol van Mn^{++} zie (49). Het totale resultaat kan een stimulering van het metabolisme betekenen, afhankelijk van de grootte van de concentratie. Interessant is bijv. de waarneming van Pirson, dat de toevoeging van Mn^{++} de CO_2 -assimilatie van de protist *Chlorella* plotseling kan doen toenemen (31).

Waar de metabolismen der verschillende protisten wel vaak veel gemeen hebben, maar de relatieve hoeveelheden der enzymen verschillen kunnen, is het begrijpelijk, dat de volgorde van de werkzaamheden der alkali- en aardalkali-ionen als chemotactica voor verschillende organismen verschillend kan zijn.

4. 6. *Chemotaxis door driewaardige metaalionen*

Alhoewel ons geen geval bekend is, waarbij een trivalent metaalion het chemotacticum is, is dit op grond van het voorgaande geenszins uitgesloten, als het Me^{+++} weer gemakkelijk dissocieert van de aanhechtingsplaats. Hervey (68) toonde aan, dat Cr^{+++} in sublethale dosering soms een stimulans is voor algen. Het zou voor de, met de hogere algen verwante, phytoflagellaten dan wel eens een chemotacticum kunnen zijn. Andere onderzoekers toonden reeds eerder aan, dat Cr^{+++} door zijn werking in bepaalde concentraties op bepaalde enzymen bijv. bij *Penicillium chrysogenum* de penicilline-uitscheiding stimuleert (69), een positieve werking op het bransteenzuurdehydrogenase-cytochroom systeem (70) en een negatieve werking op urease heeft (71).

*) Vergelijk appendix 9.

4. 7. Chemotaxis door phosphaat-ionen

Dat phosphaat vaak als chemotacticum dienst kan doen, bijv. voor de zoösporen van *Saprolegnia* (Pfeffer (4), Stange (50)) en verscheidene bacteriën (Knip (51)), is begrijpelijk, als we letten op het feit, dat het een component is van A. T. P. en van vele andere tussenproducten in het metabolisme. Als de in de cel aanwezige concentratie een beperkende factor is voor de opbouw van A. T. P., kan een verhoging van de phosphaat-concentratie, bijv. doordat een protist in een chemische val met KH_2PO_4 zwemt, de A. T. P.-productie plotseling verhogen. (vgl. (15)). Te memoreren valt ook, dat phosphaat-ion een activator voor alle reacties van de citroenzuur-cyclus is gebleken bij hersenweefsel (52).

4. 8. Chemotaxis door narcotica

Rothert (8) vond, dat twee van de door hem onderzochte bacteriën, behalve door vele andere stoffen ook door aether in een bepaalde concentratie „aangelokt” werden (positieve phobochemotaxis) en dat hogere concentraties „repulsief” werkten (negatieve phobochemotaxis). Dit verschijnsel kunnen we in het licht van de moderne enzymchemie gemakkelijk met onze chemotaxishypothese in overeenstemming brengen. Bij de chemotaxis door aether wordt waarschijnlijk plotseling en reversibel een ander A. T. P.-vragend proces dan dat van het bewegingsapparaat, geremd. Hierdoor krijgt het bewegingsapparaat een grotere toevoer van energieleverende stof (vergelijk de chemotaxis-hypothese in § 3.1.).

Een soortgelijke verklaring gaf Reiner voor de stimulering van de totale stofwisseling van gist door NaF (58). F^- -ion heeft een sterk remmende invloed op A. T. P.-ase, het enzym dat A. T. P. ontleedt tot A. D. P. (= adenosine-diphosphaat). Indien bijv. de phosphorylering van hexose door A. T. P. de beperkende stap is in de keten van processen, die hexose oxyderen tot CO_2 en H_2O , doordat de aanvoer van A. T. P. beperkt is, dan zal een remmer van het A. T. P.-ase de A. T. P.-toevoer in de beperkende stap vergroten en zo de hele keten versnellen. Wanneer de remstof-concentratie toeneemt, worden ook andere enzymatische omzettingen beïnvloed, zodat langzamerhand de hele stofwisseling geremd wordt. Voor verdere voorbeelden van het feit dat „remstoffen” in zeer kleine concentraties stimulerend werken op allerlei levensverschijnselen (physiologische „wet” van Arndt - Schulze) vergelijk men (53, 54, 55, 56). Voorbeelden waarin een narcoticum bekende geïsoleerde enzymen remt, vindt men in (36, 37, 38, 57).

4. 9. *Opheffing van de chemotaxis door een bepaalde stof met behulp van narcotica*

Rothert (35) kon in bepaalde gevallen, door aether of chlo-roform in een juiste concentratie in het medium en de capil-lair van de Pfefferse opstelling te brengen, de chemotactische ophoping onder invloed van anders goed werkende substraten onderdrukken, terwijl de beweeglijkheid gelijk bleef. Sterkere doses deden ook de beweeglijkheid ophouden en hadden de dood ten gevolge. De werking van de narcotica op het „uitdoven" van de chemotactische gevoeligheid gebeurde onmiddellijk *).

Ook dit past goed in onze moderne voorstelling van de pho-bo-chemotaxis. De bacteriën zwommen in een verdunde substraat-oplossing volgens Rothert. Het metabolisme was nog niet maximaal en dus werkten de enzymsystemen, die de A.T.P. leverden, ook submaximaal. Bij chemotaxis door bijv. fosphaat-ion zonder aanwezig narcoticum zal door het che-motacticum plotseling de A.T.P. -productie verhoogd kunnen worden bij binnenzwemmen van de „chemische val". Een toe-gediend narcoticum blokkeert nu meer en meer de enzymen, die A.T.P. produceren. Met Florijn en Smits (59), die aan andere problemen werkten, nemen we aan, dat een zekere hoeveelheid narcoticum altijd eenzelfde deel van de daarvoor gevoelige enzymen blokkeert. (We hebben geen last van de eerder beschreven stimulering en chemotactische werking van de narcotica, daar deze bij veel kleinere concentraties op-treedt). Bij een bepaalde, geleidelijk verhoogde dosering is zo'n groot deel van het enzymstelsel geblokkeerd, dat het overblijvende deel maximaal werkt. Positieve phobo-chemo-taxis is nu niet meer mogelijk, daar deze berust op een voor-afgaande verhoogde A.T.P. -productie in de „chemische val". Het is duidelijk, dat, door nog meer narcoticum toe te voegen, de beschikbare hoeveelheid A.T.P. per tijdseenheid ook voor de normale beweging ophoudt. Het is ook mogelijk, dat het be-wegings-apparaat bovendien door de aether zelf minder effi-ciënt wordt.

Theoretisch is het denkbaar, dat er nog wel een chemotac-tische reactie mogelijk is door een tweede narcoticum, als dit tweede narcoticum andere, nog niet geblokkeerde enzymen, zodanig zou kunnen blokkeren, dat de weliswaar reeds maxi-male A.T.P. -productie plotseling alleen het motorisch appa-raat ten goede zou kunnen komen (vgl. § 4. 8.). Omgekeerd zouden we hiermee misschien kunnen nagaan of twee narcotica of hetzelfde punt in de cel aangrijpen.

*) De osmotaxis verdween eerder dan de chemotaxis.

5. Vroegere onderzoeken naar het inwendig mechanisme van de phobo-chemotaxis (zonder „echte" chemotaxisproeven).

Spruit wees in 1919 op punten van overeenkomst tussen de werking van enkele ionogene, hoofdzakelijk anorganische chemotactica op het „colloidale" protoplasma en die van electrolyten op colloïden in het algemeen (9).

Zijn twee voornaamste punten waren: de pH-invloed en enkele van de proeven van Kniep (51). De pH is van grote invloed op verscheidene colloïden en H^+ - en OH^- -ionen zijn haast universele (meestal afstotende-) chemotactica.

Kniep vond in 1905 met de Pfefferse opstelling o.a., dat $CaCl_2$ in het suspensiemedium van *Spirillum rubrum* de chemotactische werking van KCl (in de capillair) kan verminderen. Het omgekeerde vindt niet plaats. Verder vond Kniep, dat KNO_3 en NH_4NO_3 zelf geen „aanlokkende" werking op *Spirillum rubrum* kunnen uitoefenen, maar wel de chemotactische werking door KCl en NH_4Cl kunnen opheffen.

De uitzonderlijke chemotactische werking van het fosphaat-ion, dat een vrijwel universeel chemotacticum is en de chemotactische werking van het malaat-ion, dat tamelijk specifiek op varespermatozoiden werkt, haalde Spruit aldus aan:

„Het is op het ogenblik niet mogelijk om te zeggen of de (chemotactische-) reactie op fosphaat en malaat toe te schrijven is aan de bijzondere plaats, die deze verbindingen innemen in de reeks van Hofmeister, dan wel of we meer moeten letten op de meerwaardigheid van het anion".

In tegenstelling met hetgeen reeds bekend was, kwam de auteur tot de conclusie, „dat er geen specifieke (ionogene-) chemotactica zullen zijn". Spruit sprak ook niet over het toen reeds bekende feit, dat bepaalde niet-ionogene stoffen goed als chemotacticum kunnen dienen en dat deze juist heel specifiek kunnen zijn voor bepaalde organismen in heel kleine concentraties (bijv. rietsuiker voor loofmos-spermatozoiden (4), chloroform voor enkele bacteriën (8) en zuurstof voor de meeste onderzochte protisten (6a)).

In 1923 vond Merton, dat natrium- en kaliumzouten in voldoende hoge concentratie de „effectieve slag" van de ciliën van *Stentor* tijdelijk doen omkeren. Ca- en Mg-zouten doen dit niet (98). In een chemotaxis-opstelling volgens Oeffler zullen deze zouten in de gebruikte concentraties dus *Stentor* waarschijnlijk „afstoten" (negatieve chemotaxis).

Merton's werk is als het ware een detailopname van het meer omvattende chemotaxis-verschijnsel. Merton gaf geen suggesties omtrent het mechanisme van de werking van de alkalizouten, noch van de oorzaak van de inactiviteit van de genoemde aard-alkalizouten.

In 1926 breidden Mast en Nadler de proeven van Merton uit met een groter aantal zouten (99). Hun proeforganisme was *Paramecium caudatum*. Zij vonden:

1. monovalente kation-zouten bewerkstelligen in voldoende concentratie de omkeer van de ciliënslag. Bi- en trivalente kation-zouten doen dit gewoonlijk niet.
2. de duur van de omkeer is afhankelijk
 - a. van de aard van het monovalente kation-zout en
 - b. van de concentratie
3. de bi- en trivalente kation-zouten kunnen het effect van de monovalente zouten te niet doen.

Als mogelijke verklaring van het mechanisme veronderstelden zij, dat de monovalente kationen ergens („in de receptoren of elders") selectief geabsorbeerd worden en dat een „keten van physiologische processen" plaats vindt.

„Er treden veranderingen op in de electrische potentiaal van het oppervlak van het organisme of in de permeabiliteit en de structuur van de oppervlaktelaag, die weer direct of indirect impulsen opwekken in het neuromotorisch apparaat, welke impulsen naar de ciliën gaan en daar hun werking uitoefenen". Mast en Nadler, die zelf geen chemotaxis-proeven verrichten, trachten toch voor een wezenlijk onderdeel van die chemotaxis, nl. het omkeren van de ciliënbeweging van één bepaald organisme onder invloed van een bepaalde groep actieve stoffen, zich voor te stellen wat er in de cel gebeurt met het chemotacticum en hoe dit zijn werking uitoefent.

Oliphant (1938) herhaalde de experimenten van Mast en Nadler (72). Hij preciseerde, dat de anionen hierbij vrijwel geen invloed hebben en dat de volgorde van effectiviteit is $K > Li > Na > NH_4$. Hij toonde verder aan, dat de duur van het kationen-effect omgekeerd evenredig is aan de temperatuur. Oliphant haalde literatuur aan, waaruit blijkt dat monovalente kationen in Stentor, Amoeba, Actinosphaerium, Spirogyra, in de wortelharen van Trianea en in de eieren van Arbacia de viscositeit van het protoplasma verhogen en bivalente kationen de viscositeit verlagen. Zijn conclusie was, dat er een correlatie zou kunnen bestaan tussen de viscositeitsverhoging van het protoplasma en de omkeer van de ciliënwerking. Een steun hiervoor zag Oliphant nog in het feit, dat ook een omkeer van de ciliënwerking ontstaat bij hoge, vrijwel onmiddellijk lethaal werkende, temperaturen, bij welke temperaturen ook de viscositeit sterk toeneemt. De verhoging van de viscositeit zou dan via impulsen in het neuromotorische apparaat zijn invloed op de ciliënwerking uitoefenen. Overigens achtte hij de veronderstelling van Mast en Nadler niet onwaarschijnlijk. Als Oliphant's veronderstelling omtrent de correlatie tussen de viscositeitsverhoging van het protoplasma en de omkeer van de ciliënbeweging juist is, en eveneens onze hypothese over de phobo-chemotaxis (omkeer van de ciliënbewegingen door plotselinge verlaging van de toevoer van energierijke brandstof in het motorisch apparaat), dan kan men hieruit concluderen, dat een daling van het metabolisme in het algemeen met een stijging van de viscositeit gepaard gaat. Hiervoor zijn nu inderdaad verscheidene directe aanwijzingen. Voor plantencellen vergelijk men Virgin (105). Bij amoeben kan men bij enkele van de vele gevallen, waarin de viscositeit stijgt door allerlei invloeden (verandering in temperatuur, pH, narcoticum-conc. enz.), zeker aannemen dat de stofwisseling daalt (vgl. (33, 34)).

Echter Oliphant's hypothese, ontworpen door Paramaecium, zal volgens ons niet altijd opgaan. Met dinitrophenol bijv. zal men waarschijnlijk in verscheidene gevallen het metabolisme kunnen doen stijgen, waardoor de viscositeit daalt, terwijl de A. T. P. -toevoer naar het bewegingsapparaat daalt. Hierover zijn nog geen experimenten gedaan.

6. Enkele recente chemotaxis-onderzoekingen

Cook en Elvidge vonden in 1951, dat verscheidene koolwaterstoffen, aethers en esters voor de spermatozoiden van *Fucus serratus* en *F. vesiculosus* (bruinwiersoorten) een chemotactische werking hebben (101). Zij gaven geen aanwijzingen over het mechanisme van de werking der chemotactica. De auteurs spreken nog ten onrechte over diffusie-zone (p. 103).

Bielig en Medem, medewerkers van Hartmann, wezen in een overzichtsartikel van 1949 er op, dat van de stoffen, die een rol spelen bij de bevruchting van de eieren van de zee-egel *Arbacia pustulosa* en de regenboog-zalm (*Salmo irideus*), het „gynogamon I-complex" zowel

- a. „chemotactisch aanlokt" als ook
- b. „de beweeglijkheid van de spermatozoiden activeert".

Bij Arbacia is dit het echinochroom (een naphtochinonderivaat) en bij Salmo is dit het astaxanthine (een carotenoid) (97) (Vergelijk in dit verband Rothschild (16, 96)).

Over het mechanisme deelden de auteurs niets mede. Wij zijn er van overtuigd, niet met twee, los van elkaar staande, werkingen te maken te hebben, maar dat de „chemotactische aanlokking" in de kunstmatige Pfefferse opstelling het gevolg is van de plotselinge reversibele beïnvloeding van het motorisch apparaat, die met phobo-chemotactische reacties van de spermatozoid gepaard gaat.

Moewus deed in 1939 enkele mededelingen over de chemotaxis van *Chlamydomonas eugametos* (een groene en photosynthetiserende phytoflagellaat, nauw verwant met de chlorophyllvrije *Polytoma uvella*), en verwante soorten (100). Hij ondernam deze proeven hoofdzakelijk om de juistheid te bewijzen van zijn veronderstelling, dat de (alleen nog slechts door hem ontdekte) gamonen, cisl en transcroctinedimethylester, tevens chemotactica zijn. Hij concludeerde op pag. 525 tot „Damit ist nachgewiesen, dass das Sichaufsuchen der Gameten zur Kopulation ein chemotaktischer Vorgang ist und dass als Chemotaktika dabei nur die Sexual-stoffen (=de gamonen) wirken".

Op de inhoud van dit en de vele, veel besproken, eerdere artikelen van Moewus en zijn medewerkers over de sexualiteit van algen (vooral *Chlamydomonas eugametos*), de stoffen (termonen en gamonen) die bij de copulatie een rol zouden spelen, en zijn, ons inziens onjuist, gebruik van waarnemingen over de chemotaxis (in de Pfefferse opstelling) voor de verklaring van het „elkaar opzoeken" van de gameten in de natuur, willen we grotendeels niet ingaan (zie bijv. (27, 83, 116)). We zullen alleen dat onder de loupe nemen, wat voer de bestudering van het wezen van de chemotaxis belangrijk lijkt.

Moewus vond, dat verscheidene eenvoudige suikers, die *Chlamydomonas*-gameten, gesuspenderd in een voedingszouten-oplossing (dus zonder koolstofbron) in het donker (photosynthese dus uitgesloten) beweeglijk kunnen maken, ook als chemotacticum kunnen dienen in de klassieke opstelling volgens Pfeffer. De suiker, die in de laagste concentratie de organismen beweeglijk kan maken (gentiobiose bij *Chlamydomonas eugametos*) kan ook in de laagste concentratie nog een chemotactische ophoping doen ontstaan. Deze waarneming past goed in onze hypothese over de chemotaxis. De genoemde suikers hebben als (enig uitwendig) substraat snel en reversibel een invloed op het gebruik van de energierijke brandstof van het motorisch apparaat.

In het genoemde artikel trachtte Moewus niet de chemotaxis te verklaren, maar sloot hij zich aan bij de voorzichtige opmerking van Jost, dat het chemotacticum waarschijnlijk wel in het protoplasma moet kunnen dringen om daarna een chemische werking uit te oefenen (102).

7. Samenvatting

1. Er werd gezocht naar eventuele gemeenschappelijke factoren voor alle gevallen van (phobo-)chemotaxis. Waarom we ons tot de meest voorkomende vorm van chemotaxis, de phobo-chemotaxis beperkten, werd toegelicht.
2. De conclusies zijn:
 - a. We kunnen niet één, of een klein aantal concrete, directe aangrijpingspunten voor chemotactica aanwijzen, dat in alle chemotactische reagerende protisten hetzelfde is.
 - b. De eerste/enige gemeenschappelijke factor van de keten-

processen, die in de verschillende gevallen van phobo-chemotaxis (of phobo-phototaxis, phobo-osmotaxis, phobo-thermotaxis) bij de eigenlijke schrikreactie optreden, is volgens onze hypothese een plotselinge (zeer snelle) verlaging van de energie-toevoer (energie-verbruik) in het motorisch apparaat van de reagerende protist;

Of anders gesteld:

c. Iedere stof, of toestand, die plotseling en reversibel de toevoer (of het verbruik) van de energieleverende stof in het motorisch apparaat verhogen kan, kan een phobotactisch organisme (chemo-, photo-, osmo- of thermo-) in een daartoe geschikte opstelling chemotactisch (resp. phototactisch, osmotactisch, thermotactisch) „aanlokken”.

De energieleverende stof is waarschijnlijk A.T.P. (=adenosine-triphosfaat).

Aan een nadere beschouwing werden onderworpen:

- a. De chemotaxis door zuurstof, voedingsstoffen, alkali- en aardalkali-ionen, fosphaat en narcotica.
- b. De verhindering van de chemotaxis (door bijv. substraatstoffen) met behoud van de beweeglijkheid door middel van narcotica.
- c. Vroegere onderzoeken naar een mechanisme van de chemotaxis. Enkelerecente onderzoeken over de chemotaxis als onderdeel van bevruchtingsprocessen.

3. Appendix

8. 1. *Positieve en negatieve topo (phobo)-chemotaxis*

De topo- of phobotaxis wordt positief genoemd als het organisme door het agens „aangelokt” wordt, en negatief, als er een „afstoting” door plaats vindt.

Bij positieve phobo-chemotaxis treedt de schrikreactie alleen op bij het verlaten van de ophopingszone („chemische val”).

Een bepaald agens kan in een lage concentratie „aanlokken” en in een hoge „afstoten”, zodat bij een gradiënt van bijv. een chemotacticum een ophoping in een bepaald concentratie-traject plaats vindt, die soms heel scherp begrensd kan zijn. De kwestie topo- of phobo-chemotaxis staat hier los van. Rothert drukte het in 1901 aldus uit:

„Iedere verwijdering van het optimum heeft bij phobo-chemotactische reagerende organismen een schrikreactie ten gevolge”. En bij positieve topo-chemotaxis wendt het organisme zich (volgens Rothert) naar die zijde, waarop de intensiviteit van het agens maximaal is (8).

8. 2. *Opmerkingen bij de vroeger algemeen aangenomen topo-chemotaxis*

Men stelde zich bij de voorstelling van de topo-chemotaxis niet altijd duidelijk de complicaties voor ogen, die optreden, doordat vele protisten ingewikkelde banen (bijv. schroefbanen) beschrijven en niet slechts in een

plat vlak bewegen, zoals de microscopische waarneming bij de Pfefferse opstelling zo gemakkelijk suggereert.

Over de kwestie, hoe de „flanken” reageren (vgl. § 2.2.) en hoe men zich die flanken moet voorstellen bij de verschillende chemotactisch reagerende protisten, liet bijv. Pfeffer zich niet uit, evenmin als Pringsheim in zijn gedetailleerde overzichten van 1912 (6). Pas Metzner schreef hierover iets, dat gebaseerd was op waarnemingen (74).

Waarschijnlijk dacht men reeds van de aanvang van het chemotaxis-onderzoek af, aan een orthokinetisch effect, dus waarbij de „aantrekkende” stof de ciliën aan één bepaalde zijde meer of minder snel (of effectief) dan voorheen doet slaan gedurende een bepaalde tijd. Echter bij vele aanvaankelijk topo-chemotactisch gedachte organismen, kan men bezwaarlijk van aparte zijden met ciliën spreken.

8. 3. Voorbeeld van een phobo-chemotactische ophoping

Als voorbeeld van een phobo-chemotactische ophoping zullen we de reacties beschrijven van het goed bestudeerde en duidelijk waarneembaar reagerende *Paramecium* (10).

Wanneer deze organismen normaal voorwaarts zwemmen, beschrijven ze een lang gerekte schroefbaan, waarbij zij zodanig roteren, dat steeds een bepaalde zijde van het lichaam naar binnen is gekeerd *).

Stel nu, dat we een capillair met een chemotacticum-oplossing, waarvan we weten, dat het organisme erdoor „aangelokt” wordt, in een druppelsuspensie van goed bewegende *Paramecia*'s schuiven. Uit de capillair stroomt een (event. met kleurstoffen zichtbaar te maken hoeveelheid) oplossing, die als „vloei-stof-eilandje” in de grotere suspensiedruppel gelocaliseerd blijft. Dit vloei-stof-eilandje is de „chemische val” in de Pfeffer opstelling, die men vergelijken kan met de „lichtval” in de opstelling van Engelmann.

Bij onmiddellijk waarnemen met een kleine vergroting zien we, dat de organismen die toevallig de capillair naderen, gewoon voortgaan. Overschrijdt het organisme echter de grens, die het uit de „chemische val” in het medium van de suspensiedruppel terug zou voeren, dan wordt het „geprikkeld” en gaat zijn „schrikreactie” tonen. Het staakt de beweging plotseling en schrikt achteruit. Hierna gaat het lichaam in een kegelmantel draaien, waarbij het vooreinde een cirkel beschrijft. Door het teruggaan is het organisme weer in de chemische val gekomen. Het herstelt zich na enkele seconden: de kegelroterende beweging houdt op en de beweging in voorwaartse richting wordt hervat in de richting, waarin het toevallig stond toen de rotatie ophield. De voorwaartse beweging wordt ongestoord voortgezet totdat een nieuwe grensoverschrijding weer een „schrikreactie” veroorzaakt.

Jennings sprak hierbij van „trial and error”. De hoek, waaronder de nieuwe baan t.o.v. de oude staat, is dus morphologisch bepaald. Door plotseling overbrengen van een *Paramecium* uit een suspensie in een chemotacticumoplossing naar leidingwater heeft dezelfde reactie plaats. (Waar het organisme nu niet terug kan „vluchten” in een chemische val, blijft de „prikkel aanhouden”. Het complex van veranderingen van beweging blijft nog even voortduren, waarna het organisme weer normaal gaat bewegen (zich „aangepast” heeft) of tot rust komt (Vergelijk Jennings (10)).

Het resultaat van de schrikreacties in de Pfefferse opstelling is de geleidelijke ophoping van alle organismen in de chemische val.

*) Voor een beschrijving van de morphologie van *Paramecium* verwijzen we naar Kalmus (60).

8. 4. De pseudo-topo-phototaxis

Waar Pringsheim een pseudo-topo-chemotaxis, analoog aan de pseudo-topo-phototaxis, mogelijk achtte ^{*)}, geven we met het oog hierop eerst een korte beschrijving van de pseudo-topo-phototaxis.

Dank zij het werk van Cohn, Engelmann en anderen weten we, dat vele, meestal photosynthetiserende, organismen (purperbacteriën, flagellaten enz.) phobo-phototactisch opgehoopt kunnen worden in een lichtval volgens Engelmann (11, 41, 43). Hierbij bevinden de organismen zich in een dunne vloeistoflaag op bijv. een objectglaasje, event. afgedekt met een dek-glaasje, terwijl er een plekje met een andere lichtintensiteit (of kleur) in het gezichtsveld van de microscoop geprojecteerd wordt met lichtstralen, die loodrecht door het preparaat gaan. De organismen kunnen hierbij practisch alleen loodrecht op de lichtstralen bewegen en waargenomen worden. Van topo-phototaxis kon men spreken, toen bleek dat verscheidene organismen, zoals bijv. *Euglena viridis* en *Stentor* in een daartoe geschikte opstelling ook in de richting van de lichtstralen kunnen zwemmen in een overigens gelijkmatig verlichte ruimte dank zij de phobotactische reactie op lichtprikkels, gecombineerd met de aanwezigheid van een excentrisch gelegen lichtgevoelige plek voor de oogvlek en een bepaalde roterende manier van voortbewegen. Zolang het organisme in de richting van het licht zwemt wordt de lichtgevoelige plek voortdurend gelijkmatig belicht. Bij afwijking van deze baan wordt de lichtgevoelige plak niet meer gedurende een hele rotatie maximaal verlicht. Schrikreacties treden dan in en houden aan totdat een richting evenwijdig aan de lichtstralen weer ingenomen wordt („trial and error") Jennings (10). (deze proeven zijn later door anderen herhaald en uitgebreid tot meer organismen met een oogvlek (26, 92, 93)). Hierbij reageren dus niet „de geprikkelde flanken onafhankelijk" maar zorgt de zojuist genoemde typische combinatie voor een topotactische instelling. Jennings sprak van een pseudo-topo-phototaxis om te beklemtonen, dat de door hem ontdekte topo-phototaxis en de reeds eerder bekende phobo-phototaxis (en de phobo-chemotaxis) op dezelfde „schrikreacties" berusten. Buder heeft o.i. gelijk, als hij in 1919 erop wijst, dat de toevoeging „pseudo" de aanduiding van het topotactische karakter te zeer verzwakt (92).

Phototactische organismen zonder oogvlek, zoals bijv. *Paramecium bursaria* en de purperbacteriën kunnen alleen phobotactisch reageren en dus niet in de richting van de lichtstralen richten.

8. 5. Pseudo-topo-chemotaxis

Pringsheim veronderstelde in 1912, dat de nog als topo-chemotactische bekend staande organismen (varen- en mosspermatozoiden, *Saprolegnia*-zoösporen en de flagellaat *Trepomonas agilis*) „pseudo-topo-chemotactisch zouden reageren analoog aan de pseudo-topo-phototactisch reagerende infusoriën en flagellaten (6a en 6b) (Vgl. appendix 4).

In plaats van een lichtgevoelige plek (appendix 4) zou dan een speciale plek, gevoelig voor chemotactica aanwezig moeten zijn (pag. 360 van 6b). In plaats van evenwijdig licht is dan alleen een concentratiegradiënt van het chemotacticum als richtingaangevende factor mogelijk. Dit laatste zou het weer nodig maken, dat het organisme snel en geleidelijk „went" („zich aanpast") aan de steeds hogere concentratie, waarin hij zwemt. Want een afwijking van de, aan de concentratiegradiënt evenwijdige richting, die de „chemische gevoelige plek" op een bepaald moment in een iets lagere concentratie brengt dan wanneer hij evenwijdig zou zijn blij-

x) Zie appendix 5.

ven zwemmen, moet een „schrikreactie” kunnen veroorzaken, zodat hij door „trial and error” weer in de goede richting kan komen. Een „wennen” aan hogere concentraties, zodat een hele ophoping van organismen in een concentratiegradiënt langzaam voor steeds hogere concentraties „terugschrikt” is wel bekend (pag. 300 van 6a), maar bij de pseudo-topo-chemotaxis zou het organisme wel bijzonder vlug moeten „wennen” door de voortdurend gerichte beweging naar hogere concentraties. De pseudo-topo-chemotaxis lijkt ons heel onwaarschijnlijk. Verwarrend werken de volgende feiten:

1. Pringsheim wilde Jennings' hypothese van 1910, dat „ook de genoemde organismen wel phobotactisch zouden reageren”, met literatuurvoorbeelden bevestigen (pag. 299 - 305 van (6a en pag. 187 van (10)).
2. De pseudo-topo-phototaxis was experimenteel aangetoond (10), maar de „instelling in de diffusierichting” (topo-chemotaxis) werd bij de genoemde organismen door vroegere onderzoekers en door Pringsheim aangenomen (pag. 305 van (6a)). Deze aanname berustte gedeeltelijk op waarnemingen en gedeeltelijk op gebrek aan bewijs van een phobo-chemotaxis (vgl. § 2.3.).
3. Pringsheim plaatste de proeven, die de kwesties, phobo- of topo-chemotaxis en phobo- of topo-phototaxis raken, als gelijkwaardig naast elkaar. Vaak schreef de auteur daardoor ook slechts topo- en phobotaxis, zonder de aanduidingen chemo-, photo-, enz. (Vgl. Pringsheim (6a) pag. 300-302 en (6b) pag. 360).
4. De auteur beperkte in deze artikelen de aanduiding „topotaxis” tot die gevallen, waarin de „geprikkelde flanken” onafhankelijk kunnen reageren ((6a) pag. 300 en (6b) pag. 351 en 360). De pseudo-topo-phototaxis achtte hij dus in tegenstelling met de definities (vgl. § 2.2 en appendix 4) niet onder de topotaxis te vallen maar wel onder die van de phobotaxis.
5. Merkwaardig is, dat Pringsheim „echte” topo-chemotaxis door onafhankelijk reagerende flanken als mogelijkheid voor de varen-spermatozoiden niet overwoog.
6. Ook in 1923 vergelijkt Pringsheim de „duidelijke topo-chemotaxis” (van *Polytoma uvella*) met de pseudo-topo-phototaxis (van *Chlamydomonas*) (pag. 116 van (7)).

Onze ervaring is dat de *Polytoma*'s te snel bewegen om goed waargenomen te worden. Alleen het eindresultaat van de ophoping is evident. Zeer waarschijnlijk reageren ze phobo-chemotactisch (vgl. hoofdstuk II).

8. 6. De chemotactische „sensibiliteiten”

Vroegere onderzoekers besloten tot de indeling in chemotactische „sensibiliteiten”. Shibata (63) onderscheidde bijv. bij de varen-spermatozoiden één chemotactische sensibiliteit voor het appelzuur-ion en de andere werkzame organische anionen, één voor het OH ion (alleen bij *Isoëtes*-soorten) en één gemeenschappelijke voor metaal-ionen (en het H^+ ion bij *Equisetum* en *Salvinia*) en de alkaloiden. Voor het onderscheiden van sensibiliteiten bij bacteriën verwijzen we naar de literatuur (3, 8, 51). De criteria voor het besluit, of de stoffen tot dezelfde „sensibiliteit” behoorden, waren:

- a. de gelijke beïnvloeding door een derde stof
- b. de wederzijdse afstomping volgens de wet van Weber-Fechner (dus A in de capillair „lokt” niet aan door de aanwezigheid van B in een bepaalde concentratieverhouding in het milieu).
- c. het additievermogen van subminimale concentraties van twee actieve stoffen (6a).

Door het algemeen stellen van het probleem, gebruiken wij deze indeling in sensibiliteiten niet, al zal hier zeker een sleutel voor gedetailleerder onderzoek aanwezig zijn. Men zou kunnen zeggen, dat steeds één

„sensibiliteit“, nl. de grotere of kleinere toevoer van brandstof voor het voortbewegingsmechanisme indirect beïnvloed wordt.

8. 7. *Verband tussen de snelheid van beweging en de gevoeligheid van de chemotactische reactie*

Verscheidene auteurs wezen er op, dat de chemotactische reactie des te beter gaat, naarmate de organismen in het buitenmedium reeds sneller bewegen. Iedere verlangzaming door abnormale bouw (Pfeffer (1884) pag. 381), ouderdom (Pringsheim (1923)), te veel afwijkende temperaturen (Voegler (1891) pag. 7), narcotica (Rothert (1904), te lang achtereen, overenten op een vaste voedingsbodem (Rothert (1901) pag. 411); Kniep (1906) pag. 220), of „omstemmingen“ door onbekende oorzaak (Kniep (1906); Pringsheim (1924) maakt, dat de organismen minder goed reageren (4, 7, 51, 62, 66, 87). Vergelijk ook Kusano (1909) pag. 36 en Pringsheim (1912a) pag. 303 (6, 14).

Uit deze feiten kunnen we concluderen dat, wil er een goede chemotaxis te zien zijn,

1. de verandering van de chemotacticum-concentratie met de tijd groot moet zijn en/of
2. de stofwisseling voldoende intensief moet zijn en/of
3. de permeabiliteit voor actief opgenomen stoffen, samenhangend met punt 2. voldoende groot moet zijn.

Ad. 2 kunnen we wijzen op de proeven van von Brand, Tobie en Mehlman (88), waaruit bleek, dat door bepaalde bekende enzymremstoffen gelijktijdig de beweeglijkheid en de ademhaling daalden bij de door hen onderzochte trypanosomen (parasitaire flagellaten). Pringsheim (pag. 361, (1912b)) wijst er op, dat „sterk metabolische“ Euglena's (in phototaxisproeven) de „mooiste schrikreacties“ geven (6).

8. 8. *Verband tussen de phototaxis en de photosynthese*

Op de phototaxis willen we iets dieper ingaan, daar op dit terrein reeds tussen 1881 en 1888 door Engelmann een verband met de photosynthese, dus met een onderdeel van het metabolisme aangewezen werd. Engelmann vond o. a., dat een dunne laag van *Bacterium photometricum* (een purperbacterie) een absorptie-spectrum (maxima bij 500, 530, 590 en 850 mμ) heeft, dat ongeveer samenvalt met de spectrale verdeling van de phototaxis in een micro-spectrum (11, 43). Vgl. ook pag. 11 van (90). Bij andere organismen had hij vastgesteld dat zo'n absorptie-spectrum samenvalt met de spectrale verdeling van de photosynthese. Deze beide gegevens combinerend, concludeerde hij tot de aanwezigheid van een photosynthese-apparaat bij *Bacterium photometricum* en correleerde hij dus gelijktijdig de phototaxis met de photosynthese. Reeds eerder had hij aangetoond dat deze bacterie phobo-phototactisch opgehoopt kan worden in een „lichtval“ (41). De bacterie vertoont pas een schrikreactie, als hij uit de lichtval in het donker gaat, dus als de photosynthese daalt.

Onder anaerobe omstandigheden, verzamelt *Paramecium bursaria* zich in een micro-spectrum op de plaatsen, waar het chlorophyll absorptie-maxima heeft. Volgens Engelmann werkt het licht indirect door beïnvloeding van de zuurstofspanning in het lichaam van de ciliaat. Uit dit gegeven concludeerde Engelmann nu weer, dat ook de phototaxis in purperbacteriën eigenlijk een „chemotaxis voor zuurstof“ is. De suikers zullen echter ook door het photosynthese-apparaat geleverd worden, zodat we, op dit niveau redenerend, o. i. evengoed een chemotaxis voor O₂ en/of voor suikers kunnen veronderstellen.

Engelmann nam dus aan dat alle golflengtes, die phototaxis kunnen ver-

oorzaken, hun werking uitoefenen via de fotosynthese, die de leverancier van de zuurstof is, Het werk van Engelmann werd later gepreciseerd.

We vermelden hier slechts de onderzoeken met *Rhodospirillum rubrum* (een purperbacterie) door achtereenvolgens Buder (92), Van Niel en Smit (94), French (95) en Manten (90, 91), waaruit het volgende kwam vast te staan:

1. Ook het licht, geabsorbeerd door twee carotenoiden, die gelijk zijn aan, of nauw verwant met rhodopine en rhodopurpurine, kan evenals het door bacteriochlorophyll geabsorbeerd licht phototactisch werken (90, 91, 92). Deze carotenoiden werken vermoedelijk als sensibilisator van de fotosynthese (Vgl. Duysens (13)).
2. Het voornaamste carotenoid van *Rhodospirillum*, spirilloxanthine, speelt waarschijnlijk noch bij de fotosynthese, noch bij de phototaxis een rol (90, 91, 94, 95).
3. Manten vond, werkend met licht van 880 mμ, dat door bacteriochlorophyll geabsorbeerd wordt, dat de lichtintensiteit, waarbij de contrast-gevoeligheid gaat dalen, ongeveer samenvalt met de lichtintensiteit, waarbij verzadiging in de fotosynthese te verwachten is (90, 91)*). Het doel, dat Manten zich aanvankelijk stelde, nl. te bewijzen, dat het deel van de door de carotenoiden geabsorbeerde licht, dat actief is in de phototaxis, ook actief is in de fotosynthese (pag. 13 en 14 van (90)) werd enkele jaren later door Thomas en Nijenhuis van hetzelfde laboratorium verwezenlijkt door ook de fotosynthese te meten bij de betreffende golflengten (92).

Bij organismen echter, die zoals *Euglena viridis* pseudo-topo-phototactisch kunnen reageren met behulp van een oogvlek en een lichtgevoelige plek er voor, is de phototactische gevoeligheid waarschijnlijk alleen verbonden met de absorptie door de rood gekleurde pigmenten van de oogvlek (Vgl. Manten pag. 75 (90)). Hier is dus de schrikreactie, het essentiële onderdeel van de pseudo-topo-phototaxis, waarschijnlijk niet direct verbonden met een plotselinge verlaging van de fotosynthese-snelheid. Er zijn ook gevallen vermeld, waar phototaxis bij „kleur- en oogvlekloze“ beweeglijke organismen zou voorkomen (Vgl. Strasburger, geciteerd op pag. 197 van (6a) en pag. 372 van Rothert (8)).

Samenvattend stellen we ons nu voor, dat bij *Rhodospirillum rubrum* de plotseling daling van de fotosynthese, bij *Euglena viridis* in de pseudo-topo-phototaxis de plotselinge verbreking van een onbekende schakel tussen de fotosynthese en het motorisch apparaat en tenslotte bij phototactisch reagerende „kleur- en oogvlekloze“ organismen de plotselinge verbreking van een onbekende schakel tussen het metabolisme en het motorische apparaat de toevoer (of het verbruik) van A. T. P. in dat motorisch apparaat verlaagt met als gevolg een „schrikreactie“.

8. 9. De invloed van K^+ , Ca^{++} enz. op de structuur van de biocolloïden

Tot dusver hebben we de invloed van anorganische ionen, voor zover van belang voor de chemotaxis, hoofdzakelijk nagegaan op de snelheid van enzymatische omzettingen. Volledigheidshalve zullen we nog enkele feiten mededelen over het aangrijpingspunt van de ionen in de proteinestructuren van de cel.

*) Onder contrast-gevoeligheid verstaat men hier de gevoeligheid, waarvoor een organisme op de grens van twee ruimtes met verschillende lichtintensiteiten van dezelfde golflengte bij positieve phobo-phototaxis de grotere lichtintensiteit kan „kiezen“.

Pas als I_2 tenminste $n \times$ groter is dan I_1 , welk getal over een breed gebied van intensiteiten ongeveer constant is (wet van Weber-Fechner), wordt het organisme in de ruimte met I_2 opgehoopt.

Overton, Lilly, Loeb, Höber en anderen (25) trachtten tussen ~1900 en 1940 de invloed van anorganische ionen op de „activiteit“ van de cel te correleren met de rol, die deze ionen uitoefenen op de elektrische lading en de hydratatie van de biocolloïden. Deze onderzoekers vonden steun voor zulk een correlatie in het feit, dat ongeveer dezelfde volgorde van anorganische an- en kationen (lyotrope reeks van Hofmeister) optrad voor de werking op de colloïdale proteïne-oplossingen in vitro, als voor de invloed op de „celactiviteit“. Hun voornaamste proefobjecten waren spieren en zenuwpreparaten. Het criterium van de invloed op de celactiviteit was meestal de exciteerbaarheid van de spier.

Bij deze studies werd vooral de aanwezigheid en beïnvloeding van een uit proteïnen en lipido-proteïnen opgebouwde plasmamembraan, die „geopend“ wordt door alkali-ionen (K^+) en „gesloten“ door aardalkali-ionen (Ca^{++}), beklemtoond.

Een verklaring, waarom de exciteerbaarheid veranderd wordt door de verschillende ionen, kon niet echt gegeven worden.

Höber kwam tot de conclusie, dat de prikkeling een reversibele toename van de permeabiliteit voor ionen was, die veroorzaakt wordt door een beperkte en voorbijgaande verstoring van de colloïdale plasmamembraan ((25 pag. 350). Door Bungenberg de Jong, Booy en medewerkers zijn modellen voor plasmamembranen ontworpen, bestaande uit gecondenseerde complexe colloïd-systemen (107, 108). Men kan hiermede zowel de lipoïed- als de ultrafiltertheorie (vgl. bijv. 104, 105, 106) van de osmotische opname van allerlei stoffen in één beeld omvatten. Verscheidene eigenschappen van plasmamembranen kunnen ermee verklaard worden zoals de „openende“ werking van K^+ -ionen, de „verdichtende“ werking van Ca^{++} -ionen, de hoge temperatuurcoëfficiënt van de permeatie (gewone diffusie heeft een lage temperatuurcoëfficiënt) en de mogelijkheid om grote moleculen door te laten. In verband met dit laatste herinneren wij er aan, dat bijv. eiwitten chemotactica kunnen zijn voor de spermatozoiden van *Marchantia polymorpha*, terwijl o.a. T.P.N. en D.P.N. (tri- en diphosphopyridinenucleotide), folinezuur, vitamine B₁₂ en zelfs nucleïnezuren als groeistoffen voor bacteriën gevonden zijn (32), hetgeen als aanwijzing voor het binnendringen ervan kan worden beschouwd.

We weten echter niet in hoeverre die membraan-modellen voor de chemotactisch reagerende organismen een realiteit zijn. Bovendien zullen we ook hier waarschijnlijk een niet-osmotische (dus energie-vragende) opname van allerlei stoffen (anorganische ionen, water, kleurstoffen) moeten verwachten, die de passieve, osmotische opname overlapt (109, 110, 111, 112). Interessant is bijv. dat F^- -ion pas in *Escherichia coli* schijnt te kunnen dringen als toegevoegd barnsteenzuur (en niet glucose) als substraat dit mogelijk maakt (Aubel en Szulmaster (114)).

Ook de mitochondriën, waarin een deel van het metabolisme zich afspeelt (dit is althans bij hogere planten en dieren waargenomen) en waar o.a. A.T.P. geproduceerd wordt, bezitten iets, dat met de werking van een permeabiliteitsbarrière overeenkomt (Lehninger (67) en Laties (113)). Een gunstige invloed van K^+ -ionen kan zowel voor aparte enzymen, als voor de mitochondriën gelden.

Ook hier lukt het dus nog niet, alle gegeven over bijv. de invloed van K^+ op het cel-metabolisme en zijn functie als chemotacticum tot een geheel in elkaar te passen.

De bedoeling van ons was slechts de aanknopingspunten aan te stippen.

8. 10. Het werk van Clayton

Bij het afsluiten van ons manuscript stootten wij op de recente publicatie van Clayton over de tactische bewegingen en de metabolische activiteit van *Rhodospirillum rubrum* (122).

Clayton stelde de volgende hypothese op:

"Een tactische reactie van *Rhodospirillum rubrum* wordt bewerkstelligd door een kortstondige storing, die samenvalt met een verlaging in het metabolisme (respiratorisch en fotosynthetisch-)" (vgl. § 8.8.).

Clayton deed phototaxis- en aerotaxisproeven.

Onder metabolisme verstaat Clayton, "die phase, die belangrijk is bij het bewerkstelligen van de taxes" (pag. 209).

Wij menen, dat Clayton's hypothese voor een bijzonder geval (nl. *Rhodospirillum rubrum*) onze eigen hypothese benadert en dat de resultaten van zijn onderzoek (evenals die van Engelmann en anderen (vgl. § 8.8.)) een extra steun voor onze hypothese vormen.

1. Engelmann, T. W. ; Bot. Zeit. 39, 541 (1881).
; Pflügers Arch. 25, 285 (1881).
2. Fraenkel, G. S. en Gunn, D. L.; The orientation of animals.
Clarendon Press, Oxford (1940).
3. Pfeffer, W. ; Ber. deutsch. bot. Ges. 1, 524 (1883).
4. Pfeffer, W. ; Untersuch. bot. Inst. Tübingen 1, 363
(1884).
5. Pfeffer, W. ; Untersuch. bot. Inst. Tübingen 2, 582
(1888).
- 6a. Pringsheim, E. G. (1912a); Die Reizbewegungen der Pflan-
zen, Springer Verlag, Berlin (1912).
- 6b. Pringsheim, E. G. (1912b); Biol. Centralblatt 32, 337 (1912).
7. Pringsheim, E. G. ; Beitr. allgem. Bot. 2, 88 (1923).
8. Rothert, W. ; Flora 88, 371 (1901).
9. Spruit, C. ; De invloed van electrolyten op de tac-
tische bewegingen van Chlamydomonas
variabilis Dengeard. diss. Utrecht,
(1919).
10. Jennings, H. S. ; Das Verhalten der niederen Organis-
men, Leipzig en Berlijn (1910).
11. Engelmann, T. W. ; Pflügers Arch. 30, 90 (1883).
12. Pfeffer, W. ; Pflanzenphysiologie 2^o Aufl. 2, 755
(1904).
13. Duysens, L. N. M. ; Nature 168, 548 (1951).
14. Kusano, S. ; J. Coll. Agricult. Imp. Univ. Tokyo 2, 1
(1909).
- 15a. Johnson, M. J. ; Science 94, 200 (1941).
- 15b. Lynen, F. ; Ann. 546, 120 (1941).
16. Rotschild, Lord. ; Science Progress 40, 3 (1952).
; Biol. Rev. 26, 1 (1951).
17. Hunter, F. E. ; Hoofdstuk 5 in McElroy, W. D. en Glass,
B. (red.) Phosphorus metabolism I.
John Hopkins Press, Baltimore (1951).
18. Pringsheim, E. G. ; Planta 26, 665 (1937).
19. Beyerinck, M. W. ; Z. Bakt. 1^o Abt. 14, 827 (1893).
20. Beyerinck, M. W. ; Z. Bakt. 1^o Abt. 15, (1894).
21. Lidforss, B. ; Jahr. wiss. Bot. 41, 65 (1905).
22. Lardy, H. A. ; Hoofdstuk 8 in Mc Elroy, W. D. en
Glass, B. (red.) Phosphorus metabo-
lism I (1951).
23. Macallum, A. B. ; J. Physiol. 32, 95 (1905).
24. Boyer, P. D. , Lardy, H. A. en Philips, P. H.; J. Biol. Chem.
149, 529 (1943).
25. Höber, R. ; Physical chemistry of cells and tis-
sues, Blakiston, Philadelphia (1945).
26. Mast, S. O. ; Biol. effects of radiation. New York
en London, (1936).

27. Smith, G. M. ; Am. J. Bot. 33, 625 (1946).
28. Gray, J. ; Proc. Roy. Soc. B. 93, 104 (1922).
29. Fenn, W. O. ; Physiol. Rev. 20, 377 (1940).
30. Krogh, A. ; Proc. Roy. Soc. B. 133, 140 (1946).
31. Pirson, A. ; Z. Bot. 31, 192 (1937).
32. Hutner, S. H., Provasoli, L., Schatz, A. en Haskins, C. P.;
Proc. Amer. Phil. Soc. 94, 152 (1950).
33. Beams, H. W. en Kind, R. L.; Hoofdstuk 2 van Calkins,
G. N. en Summers, F. M. (red.) Proto-
zoa in biological research, Columbia
Univ. Press, New York (1941).
34. Seifriz, W. en Pollack, K. L.; Protoplasma 39, 55 (1950).
35. Rother, W. ; Jahrb. wiss. Bot. 39, 1 (1904).
36. Green, D. E. ; Biochem. J. 30, 629 en 2095 (1936).
37. Keilin, D. en Hartree, E. F.; Proc. Roy. Soc. B. 119, 114
(1936).
38. Stotz, E. en Hastings, A. B.; J. Biol. Chem. 118, 497 (1937).
39. Lasnitski, A. ; Nature (London) 146, 99 (1940).
Lasnitski, A. en Szorenyi, E.; Biochem. J. 29, 580 (1935).
40. Dickens, F. en Greville, G. D.; Biochem. J. 29, 1468 (1935).
41. Engelmann, T. W.; Pflügers Arch. 26, 537 (1881).
; Pflügers Arch. 29, 121 en 387 (1882).
42. Hers, H. G. ; Biochim. Biophys. Acta 8, 416 en 424
(1952).
43. Engelmann, T. W.; Pflügers Arch. 42, 183 (1888).
Bot. Zeit. 46, 661 (1888).
44. Szent Györhyi, A.; Chemistry of muscular contraction
Acad. Press, New York (1951).
45. Szent Györgyi, A.; Biol. Bull. 96 140 (1949).
46. Mommearts, W. F. H. M. en Seraydarian, K.; J. Gen. Phy-
siol. 30, 201 (1947).
47. Mommearts, W. F. H.; Biochim. Biophys. Acta 4, 50 (1950).
48. Kachmar, J. F. en Boyer, P. D.; Fed. Proc. 10, 204 (1951).
49. Plaut, G. W. E. en Lardy, H. A.; J. Biol. Chem. 180, 13 (1949).
50. Stange, B. ; Bot. Zeit. 48, 107, 124, 138, 155 en 161
(1890).
51. Kniep, H. ; Jahrb. wiss. Bot. 43, 215 (1906).
52. Green, D. E. ; Respiratory enzymes pag. 201 Burgers
Publ. Co. Minneapolis (1949).
53. Spiegelmann, S. en Reiner, J. M.; J. Gen. Physiol. 28, 385
(1945).
54. Braunnstein, A. E.; Biochem; Z. 240, 68 (1931).
55. Warren, C. O. ; Am. J. Bot. 139, 719 (1943).
56. Florijn, E., Gruber, M., Leynse, B. en Huismann, T. H. J.;
Biochim. Biophys. Acta 5, 595 (1950).
Huisman, T. H. J. ; diss. Utrecht (1950).
57. Rona, P. en Lasnitski, A.; Biochem. Z. 163, 197 (1925).
58. Reiner, J. M. ; J. Gen. Physiol. 30, 367 (1947).
59. Florijn, E. en Smits, G.; Nature (London) 164, 699 (1949).
60. Kalmus, H. ; Paramaecium, G. Fischer Verlag Jena
(1931)

61. Hoyt, D. ; Bot. Gaz. 49, 340 (1910).
62. Voegler, C. ; Bot. Z. 49, 641 (1891).
63. Shibata, K. ; Jahrb. wiss. Bot. 49, 1 (1911).
64. Goddard, D. R. ; Sectie 6 van Höber, R. (red.) Physical Chemistry of Cells and Tissues, London (1947).
65. Overton, E. ; Pflügers Arch. 92, 115 (1902).
66. Rothert, W. ; Jahrb. wiss. Bot. 39, 1 (1904).
67. Lehninger, A. L. ; Hoofdstuk 5, afd. b in Phosphorus Metabolism I (1951).
68. Hervey, R. J. ; Bot. Gaz. 111, 1 (1949).
69. Pratt, R. en Du Frenoy, J. ; Science 105, 574 (1947).
70. Horecker, B. L., Stotz, E. en Hogness, T. R. ; J. Biol. 128, 251 (1939).
71. Henry, R. J. en Smith, E. C. ; Science 104, 426 (1946).
72. Oliphant, J. F. ; Physiol. Rev. 11, 19 (1938).
73. Strasburger, E. ; Jahrb. wiss. Bot. 7, 390 (1870).
74. Metzner, P. ; Beitr. allgem. Bot. 2, 435 (1923).
75. Reichert, K. ; Zentralbl. Bakt. 1 Abt. 51, 82 (1909).
76. Ulehla, V. ; Zentralbl. Bakt. 31, 645, 657, 689, 721 (1911).
77. Buller, A. H. R. ; Annals. Bot. 14, 543 (1900).
78. Akermann, A. ; Z. Bot. 94 (1910).
79. Shibata, K. ; Jahrb. wiss. Bot. 41, 561 (1905).
80. Hoffmann-Berling, H. ; Biochim. Biophys. Acta. 14, 182 (1954).
81. Hoffmann-Berling, H. ; Biochim. Biophys. Acta. 16, 146 (1955).
- 82a. De Robertis, E. en Peluffo, C. A. ; Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 78, 584 (1951).
- 82b. De Robertis, E. en Francie, D. M. ; Program 11th Meeting Electron Microscope Soc. America (1951).
83. Foerster, H. en Wiese, L. ; Z. Natur. Forsch. 9B, 470 (1954).
; Z. Natur. Forsch. 9B, 584 (1954).
84. Fleckenstein, A., Janke, J., Davies, R. E. en Krabs, A. ; Nature 174, 1081 (1954).
86. Mommearts, W. F. H. M. ; Nature 174, 1083 (1954).
87. Pringsheim, E. G. ; Abderhalden's Handb. biol. Arbeitsmeth. 12, (2), 307 (1924).
88. Brandt, T. von, Tobie, E. J. en Mehlmann, B. ; J. Cell. Physiol. 35, 294 (1950).
89. Morowitz, H. J. ; Science 119, 286 (1954).
90. Manten, A. ; Phototaxis, phototropism and photosynthesis in purple bacteria and blue-green algae. diss. Utrecht (1948).
91. Manten, A. ; Antonie van Leeuwenhoek 14, 65 (1948).
92. Thomas, J. B. en Nyenhuis, L. E. ; Biochim. Biophys. Acta 6, 317 (1950).
92. Buder, J. ; Jahrb. wiss. Bot. 56, 529 (1915).

- Buder, J. ; Jahrb. wiss. Bot. 58, 105 (1919).
93. Metzner, P. ; Jahrb. wiss. Bot. 59, 325 (1920).
Z. Bot. 22, 719 (1937).
94. Van Niel, C. B. en Smits, J. H. C.; Arch. Mikrobiol. 6, 219 (1935).
95. French, C. S. ; J. Gen. Physiol. 21, 71 (1938).
96. Rothschild, Lord.; Internat. Rev. Cyt. 1, 257 (1952).
97. Bielig, H. J. en Medem Graf, F.; Experientia 5, 571 (1949).
98. Merton, H. ; Pflügers Arch. 198, 1 (1923).
; Biol. Zentralblatt 55, 261 (1935).
99. Mast, S. O. en Nadler, J. E.; J. Morph. Physiol. 43, 105 (1926).
100. Moewus, F. M. ; Arch. Protistenk. 92, 485 (1939).
101. Cook, A. H. en Elvidge, J. A.; Proc. Roy. Soc. B 138, 97 (1951).
102. Jost, L. ; Handw. der Naturwiss. 8, 370 (1933).
103. Bogen, H. J. ; Planta 42, 140 (1953).
104. Ruhland, W. en Heilbronn, U.; Planta 39, 91 (1951).
105. Virgin, H. I. ; Ann. Rev. Plantphysiol. 4, 363 (1953).
106. Collander, R. ; Physiol. Plant 2, 300 (1949).
en 3, 45 (1950).
107. Winkler, K. C. en Bungenberg de Jong, H. G.; Arch. neerl. physiol. 25, 431 en 461 (1940-1941).
108. Booy, H. ; Disc. Farad. Soc. on Lipoidproteines pag. 143 (1949).
109. Reinders, D. E. ; Rec. trav. bot. neerl. 39, 1 (1942).
110. Lundegardh, H. ; Physiol. Plant. 3, 103 (1950).
111. Goldacre, R. J. ; Intern. Rev. Cytol. 1, 135 (1952).
112. Bogen, H. J. ; Z. Bot. 42, 151 (1954).
113. Laties, G. ; Plant. Physiol. 28, 537 (1953).
114. Aubel, F. en Szulmaster, J.; Biochim. Biophys. Acta 5, 499 (1950).
115. Patten, B. M. ; J. exp. Zool. 17, 213 (1914).
116. Hutner, S. H. en Provasoli, L.; Hoofdstuk 2 in Lwoff, A. (red.). Biochemistry of Protozoa I, Acad. Press. Inc. New York (1951).
117. Brown, H. P. ; Ohio J. Science 45, 247 (1945).
; Oklahoma Acad. Science 31, 9 (1950).
118. Brown, H. P. en Cox, A.; Am. Midland Naturalist 52, 106 (1954).
119. Astbury, W. T. en Saha, N. N.; Nature 171, 280 (1953).
120. Manton, J., Clarke, B., Green, A. D., en Flint, E. A.; J. Exp. Bot. 3, 204 (1952).
121. Potts, B. P. en Tomlin, S. G.; Biochim. Biophys. Acta. 16, 66 (1955).
122. Clayton, R. K. ; Archiv. Mikrobiol. 22, 204 (1955).

Hoofdstuk II

ONDERZOEK NAAR DE MOGELIJKHEID OM DE CHEMOTAXIS-HYPOTHESE TE BEWIJZEN

1. Inleiding

Aan het eind van de theoretische studie over de essentie van de chemotaxis (hoofdstuk I) werd een begin gemaakt met een experimenteel onderzoek naar de juistheid van de opgestelde hypothese (zie hoofdstuk I). Een uit deze hypothese voortvloeiende tweede hypothese is, dat waarschijnlijk verscheidene stoffen, die een bepaalde protist phobochemotactisch kunnen "aanlokken" (positieve phobochemotaxis), het metabolisme direct of indirect (bijv. door een vergroting van het vermogen om de energierijke brandstof (A. T. P.) uit het metabolisch apparaat te distribueren in de cel) versnellen. Een versneld metabolisme zal zich bij aërobe organismen uiten in een grotere zuurstofopname per tijdseenheid, die we bijv. in een Warburgapparaat kunnen meten. (Chemotaxis-proeven zijn vrijwel uitsluitend met aërobe organismen verricht; waarschijnlijk in verband met de anders optredende experimentele moeilijkheden). Als voorbeeld zij gememoreerd, dat bij *Polytoma uvella* lagere alcoholen, die niet als C-bron kunnen dienen, goede chemotactica voor deze flagellaat zijn: *Polytoma uvella* wordt door deze alcoholen "aangelokt" (3). Volgens de eerste hypothese verhogen ze op een nog onbekende wijze het verbruik (de toevoer) van de energierijke stof van het voortbewegingsmechanisme (flagellen en samenhangende structuren), zodra bijv. het organisme door zijn locomotorische beweging van een concentratie C_1 in een concentratie C_2 ($C_2 \gg C_1$) van dit chemotacticum komt. Bij de overgang van C_2 naar C_1 heeft het omgekeerde plaats. Volgens de tweede hypothese is het waarschijnlijk, dat lagere alcoholen het metabolisme van *Polytoma uvella* versnellen kunnen. Op advies van Professor Dr T. H. van den Honert besloten we met de zojuist genoemde flagellaat het experimentele onderzoek aan te vangen, daar deze flagellaat gemakkelijk te kweken is en reeds eerder op chemotactische eigenschappen onderzocht werd door Pringsheim en Mainx in 1926 (3). Bovendien behoort *Polytoma uvella* op morphologisch en fysiologisch terrein tot de goed onderzochte protozoa. Alhoewel onze respiratie- en chemotaxismetingen door de beperkte tijdsduur, die aan dit onderdeel van onze

onderzoekingen besteed kon worden, en de noodzaak, het Warburgapparaat eerst te verbeteren, niet verder dan het oriënterende stadium gekomen zijn, lijken ze ons interessant om te vermelden.

2. Materiaal en methoden

2. 1. *Techniek van het chemotaxis-onderzoek*

Voor het meten van de chemotaxis werd de opstelling van Pfeffer gebruikt (8, 23). In overeenstemming met latere onderzoekers (3, 8) vulden wij de capillair (0,2 mm $\emptyset$ en ca 10 mm lang) door de vloeistof te laten opzuigen. Hiertoe werd met een, in een heel fijne pincet vastgehouden, capillair, het oppervlak van de te onderzoeken oplossing aangeraakt. Het onder-eind van de verticaal gehouden capillair werd omhoog gedraaid en voorzichtig afgesloten met een kleine hoeveelheid zuivere vaseline. Het oorspronkelijke boven-eind werd onder een hoek van ca 45° met een dek-glaasje aangeraakt om eventueel iets uitgeperste vloeistof te verwijderen. Dit eind werd nu in de opening tussen een objectglas en een, eenzijdig door een glasdraad ondersteund, dek-glaasje (24 x 24 mm) tot het midden van een daar reeds aangebrachte suspensie met *Polytoma's* geschoven. De glasdraad was iets dikker dan de capillair. Van aerotaxis hadden we geen last, daar de waarnemingen meestal slechts enkele minuten of nog korter duurden. Om dezelfde reden was een luchtbel in de capillair overbodig. Waargenomen werd met een microscoop (vergroting 120 x) of er al dan niet ophoping van de micro-organismen plaats vond. Objectglasa's en dek-glaasjes werden achtereenvolgens behandeld met een kokende oplossing van Teepol, verdund zoutzuur, leidingwater en afgespoten met aq. dest. De glaasjes werden in alcohol bewaard, er vlak voor het gebruik uitgehaald met een pincet, afgespoten met aq. dest. en gedroogd met een schone linnen doek. De capillairen werden vlak voor het gebruik uit schone buizen (0,5 cm $\emptyset$) van zacht glas getrokken. Pringsheim verkreeg recht afgesneden capillairen door ze op een glasplaat met een schrijfdiamant te krassen en vervolgens te breken. Wij vonden een gemakkelijker methode. De getrokken capillair werd afgebroken tot op ca 10 cm lengte en met een pincet in een stukje dikwandige capillair buis (ca 4 cm lang), waarin hij met wat spelende paste, gebracht. Een er uit stekend stukje capillair van de juiste lengte werd met een pincet voorzichtig beetgepakt en afgebroken. Meestal gaf dit rechte randen. Gezorgd werd voor niet te dichte suspensies van organismen, daar dit het waarnemen bemoeilijkt. Voor de bereiding van de suspensie zie hoofdstuk IV. Voor het medium van de *Polytoma's* zie hoofdstuk VIII.

2. 2. *Techniek van de respiratie-metingen*

Een conventioneel apparaat (Warburg-apparaat van de Arthur H. Thomas Company, Philadelphia, U.S.A.) met 14 constant volumerespirometers en een rechthoekige thermostaat werd gebruikt (4). Voor critische werken bij de respiratiemetingen in het bijzonder met protozoa verwijzen we naar Hall (6) en Jahn (12). De verbetering van de thermostaat van het beschikbare apparaat eiste vrij veel zorg en tijd. Er werden aangebracht (in samenwerking met Dr W. Brackman): a) twee beter geplaatste roermotors in plaats van de oorspronkelijke enkele. b) een verwarmingskabel op de bodem van de bak i. p. v. het enkele dompeplichaam bovenop. c) een thermometer-reguleur met kleiner kwikreservoir. d) een uitwendige isolatie van de dunne metalen wanden met „hardboard“.

De temperatuurverschillen in de bak werden hiermede van ca 1°C tot minder dan 0,01°C teruggebracht. In het centrale vat van de Warburg-vaatjes werd 0,2 ml 20% KOH gebracht en een rolletje Whatman No. 40 filtreerpapier (zetmeelvrij; neemt daardoor geen zuurstof op) (6).

Een gebruikelijke vulling was 2,7 ml suspensie in het hoofdvaatje en 0,3 ml oplossing van een chemotacticum in het zijvaatje. De vaatjes en de daarmee verbonden barometerruimte hadden een gezamenlijk volume van ongeveer 9 ml. Bij het meten van de invloed van alcoholen op de ademhaling gebruikten we voor ieder vaatje met suspensie en alcohol een controlevaatje met leidingwater i. p. v. de suspensie, om fysische effecten (volume-contractie) te kunnen elimineren. De werkt temperatuur was 19°C of 25°C + 0,01°C *). De schudfrequentie was 50 rotaties per min. (vgl. § 3.1.4. van dit hoofdstuk en hoofdstuk III). Voor een voorbeeld van verkregen resultaten zie de grafiek (fig. 1).

2. 3. De *Polytoma uvella* stam

De *Polytoma* stam ("Polytoma uvella strain I"), waarmee de proeven verricht werden, was ons in 1948 welwillend toegezonden door Professor Dr E. G. Pringsheim (Botany school, Cambridge, England). Reeds eerder was Mej. Dr N. de Vries van het Botanisch Laboratorium te Leiden zo vriendelijk geweest, om op verzoek van Professor Dr T. H. van den Honert een *Polytoma* stam speciaal voor ons te isoleren. Zelf isoleerden we een derde stam met behulp van de grond- en waterophopingstechniek, overenten op synthetische vloeibare media (0,2% natriumacetaat; 0,2% glucose; 0,2% glycine; 0,02% KH_2PO_4 ; 0,01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,02% Na_2CO_3 en 10 vol. % gistwater), centrifugeren en afstrijken op agarplaten.

Voor de morfologie verwijzen we naar de literatuur (17, 18, 19, 20) en voor de voeding naar hoofdstuk VIII en de literatuur (3, 17, 20, 21).

2. 4. Chemicaliën

De gebruikte vetzuren en alcoholen waren door destillatie gezuiverd.

Alle stoffen werden in decimale molaire verdunningen onderzocht.

Ter bereiding van hogere vetzuren met een oneven aantal C-atomen per molecuul werd een synthese uitgewerkt (16).

Deze vetzuren werden evenwel niet in het onderzoek betrokken (vgl. § 3.2.). De natriumzouten van de vetzuren werden bereid door berekende hoeveelheden natriumaethanolaat en zuiver vetzuur in alcohol bijeen te brengen. De zouten van de vetzuren met 6 of meer C-atomen per molecuul werden uit de alcoholische oplossingen met petroleumaether (40-60°) als witte poeder neergeslagen. Het indampen van de ontstane soms geleiachtig neergeslagen in alcohol leverde nl. anders bezwaren op door spatten en verkleuren.

Een wateranalyse, ten tijde (11 Sept. 1950) van deze onderzoekingen welwillend verstrekt door de Leidse Duinwater Maatschappij gaf als samenstelling:

Verdampingsresidu 484; gloeirest 48; " KMnO_4 " 8,9; Cl^- 50,6; NO_3^- 1,8; NO_2^- o, -; SO_4^{--} 62,7; H_2S o, -; NH_4 o, -; Fe o, -; Fe_2O_3 o; Ca^{++} (CaO) 113,1 (158,3) p. p. m; tijdelijke hardheid in Duitse graden 13,5; totale hardheid in Duitse graden 17,2; vrije O_2 (18,5°) 5,2 p. p. m.

Ter vermijding van calciumzoutneerslagen moesten van $\text{C}_n\text{H}_{2n-1}\text{O}_2\text{Na}$ voor $n = 8$ de oplossing 10^{-1} mol, voor $n = 9$ de oplossing 10^{-2} mol en voor $n = 10, 11, 12$ en 13 de oplossing 10^{-3} mol nog met aq. dest. gemaakt worden.

*) Tussen 18° en 28°C was de respiratie vrij constant, zowel met als zonder een exogene koolstofbron (bijv. butyraat).

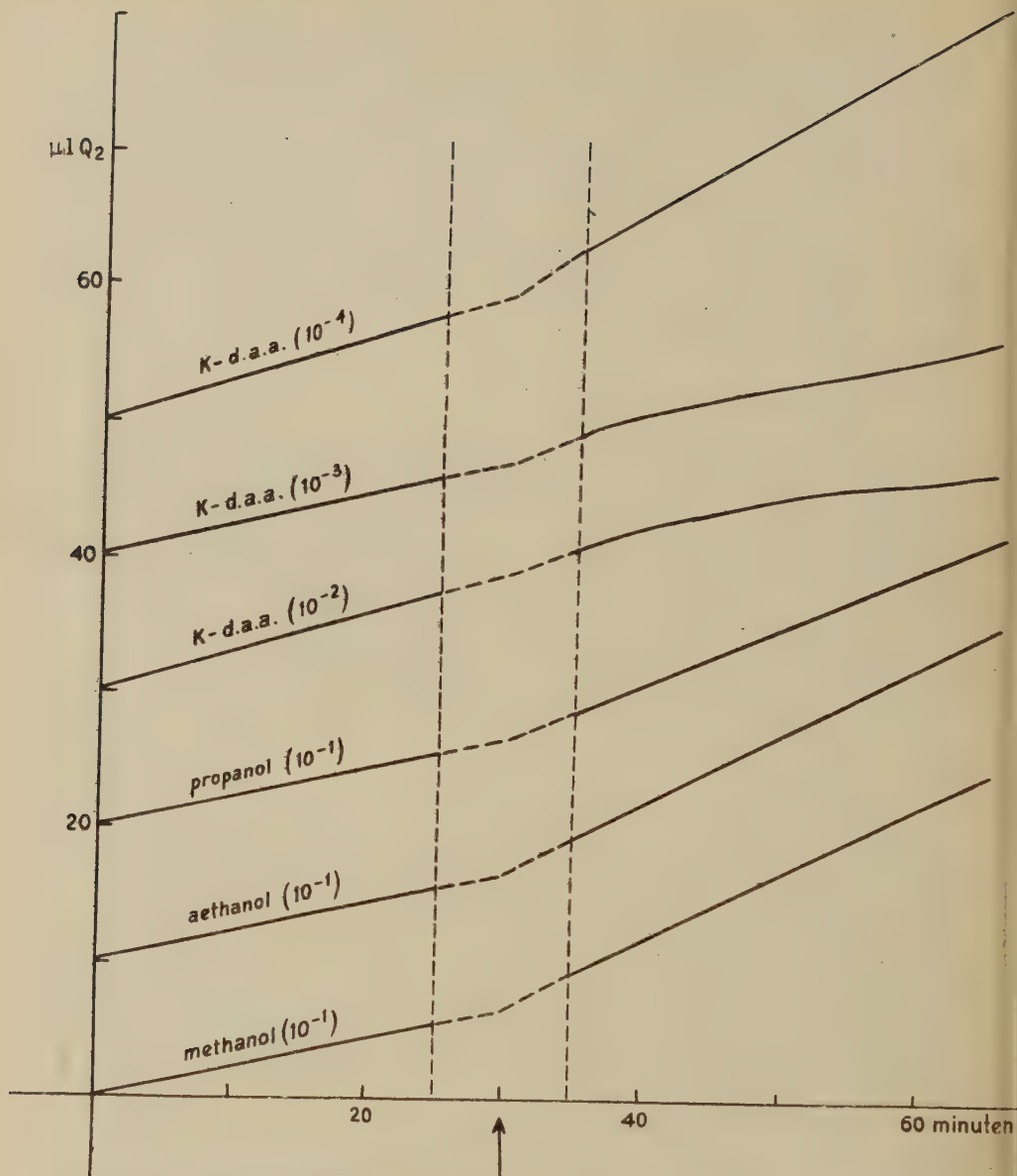


Fig. 1. De invloed van methanol (10^{-1} mol), aethanol (10^{-1} mol), propanol (10^{-1} mol) en K-(di-n-amyloacetaat) (10^{-2} , 10^{-3} en 10^{-4} mol) op de respiratie van *Polytoma uvella*. In het tijdsverloop van 25 tot 35 min. na het begin werd niet gemeten. Dertig min. na het begin werd de chemotacticum-oplossing bij de suspensie gevoegd. Oplosmiddel: leidingwater. Temperatuur: 19°C . De op een „asparagine-acetaat” medium gekweekte *Polytoma*'s werden 4 x geconcentreerd. Voor verdere gegevens zie § 2.

3. Resultaten en discussie

3. 1. Chemotaxis en respiatiemetingen

3. 1. 1. Enige verzadigde aliphatische carbonzuren

Na-acetaat en Na-butyraat konden nog in een conc. van 10^{-4} molair de *Polytoma*'s binnen enkele minuten chemotactisch ophopen. In deze concentraties verhoogden zij ook de respiratie met ca 30%. Een $10 \times$ hogere concentratie werkte veel sterker stimulerend op de respiratie. Beide carbonzuren zijn goede koolstofbronnen voor *Polytoma uvella*, zodat de respiratieverhoging reeds op grond hiervan verwacht kon worden.

De grensconcentraties in de chemotaxis voor de zouten van de vetzuren $C_2H_{2n}O_2$ ($n = 2 \rightarrow 8$) bleek onafhankelijk van de beide door ons gebruikte media te zijn: (0,2 acetaat, 0,2% glycine, 0,2% glucose) en (0,8% acetaat, 1% asparagine), resp. het "oude" en het "nieuwe" medium (vergelijk hoofdstuk VIII).

De chemotactische gevoeligheid van de organismen (volwassenen) bleek, evenals die van de pas uit het palmellastadium gekomen jonge zwermers (vergelijk Pringsheim en Mainx (3)) vrijwel constant te blijven gedurende verscheidene dagen, ook al worden door ouderdom steeds meer organismen onbeweeglijk. De chemotaxis komt door de lagere bewegingssnelheid wel langzamer tot stand en wordt onduidelijk.

3. 1. 2. Methanol, aethanol en propanol

Deze alcoholen waren chemotactisch actief in een concentratie van 10^{-1} mol (ca 0,5%). In deze concentratie verhoogden zij ook de respiratie van de *Polytoma*'s 2 à 3 $\times$ (zie fig. 1).

De alcoholen zijn geen geschikte koolstofbronnen voor *Polytoma uvella* (3, 20, 21) en hoofdstuk VIII), zodat de respiratieverhoging hierdoor niet à priori te verwachten was. Integendeel zou men vanwege de veelal narcotische werking van de lagere alcoholen misschien zelfs eerder een verlaging van de respiratie voorspeld hebben. De chemotactische gevoeligheid van de organismen bleek, evenals die van de pas uit het palmellastadium gekomen jonge zwermers (vgl. (3)) vrijwel constant te blijven gedurende verscheidene dagen. Vlg. § 3. 1. 1.

3. 1. 3. De kaliumzouten van di-n-amylazijnzuur en α -naphthylazijnzuur

Deze zouten bleken in relatief heel lage concentraties nog chemotactisch te werken: het K-(di-n-amylacetaat) van 10^{-4} tot 10^{-6} molair en het K-(α -naphthylacetaat) van 10^{-3} tot 10^{-4}

molair *). Vooral di-n-amylazijnzuur valt op vergeleken met bijv. boterzuur (10^{-4} molair). De respiratie-beïnvloeding werd alleen gemeten met het K-zout van di-n-amylazijnzuur. 10^{-4} molair gaf dadelijk een stimulering te zien. 10^{-2} molair gaf na ~ 25 min. een remming (zie fig. 1).

Naphthylazijnzuur is bekend door zijn groeistofwerking bij hogere planten; di-n-amylazijnzuur vertoont daarbij een syner-gistisch effect (24, 26, 28). Het zou interessant zijn, ook andere plantengroei- en remstoffen (indolylazijnzuur, cis- en transkaneelzuur, gesubstitueerde phenoxyazijnzuren enz.) op chemotactische werking bij *Polytoma* en andere protisten te onderzoeken en deze te vergelijken met de invloed er van op de ademhaling.

3.1.4. Enkele andere stoffen

Glucose, waarvan bekend is, dat het niet als koolstofbron door *Polytoma uvella* kan worden gebruikt ((3) en hoofdstuk VIII) en geen chemotacticum voor dit organisme is, had ook geen invloed op de respiratie.

Uitsluitend op respiratie-beïnvloeding werden door ons o. a. onderzocht: aethylacetaat ($10^{-2} \rightarrow 10^{-5}$), Na-succinaat ($10^{-2} \rightarrow 10^{-4}$), Na-citraat ($10^{-2} \rightarrow 10^{-3}$) en chloromycetine ($10^{-4} \rightarrow 10^{-6}$ molair **). Geen of geen duidelijke invloed werd gevonden. Het is mogelijk, dat de betrekkelijk lage schudsnelheid (50 r.p.m.) in bepaalde gevallen met te veel protisten in het Warburgvatje de oorzaak er van werd, dat de gasuitwisseling tussen vloeistof- en gasphase een beperkende factor werd bij de metingen.

Hierdoor kan een eventueel effect op de respiratie gemas-keerd zijn. (Vgl. (4) pag. 10, (6) pag. 100 en hoofdstuk III). De mogelijkheid om de *Polytoma*'s sneller te schudden, zodat toch kleine invloeden op de respiratie te meten zijn ondanks het waargenomen (in hoofdstuk III beschreven) schudeffect, dient in verband met het bovenstaande nog eens nader bestudeerd te worden. K-2.4 - dinitrophenolaat had in de concentraties $10^{-4} \rightarrow 10^{-6}$ molair geen duidelijke invloed op de respiratie. Met 10^{-3} molair was gedurende een uur na het mengen niets bijzonders waar te nemen, maar hierna trad een sterke stimu-lering van de respiratie op.

Joodacetamide had in de concentraties $10^{-3} \rightarrow 10^{-6}$ molair geen zichtbare invloed op de respiratie. Bij 10^{-2} molair trad na een half uur een remming op.

*) In grotere concentraties dan respectievelijk 10^{-4} en 10^{-3} molair ont-staan waarschijnlijk Ca-zoutneerslagen in leidingwater. We zagen nl., wanneer deze grotere concentraties in aq. dest. onderzocht werden in de capillair van de Pfeifferse opstelling en de *Polytoma*'s weer in lei-dingwater opgeslibd waren, een kleurloze prop in de capillair mond, waarin de *Polytoma*'s gevangen gehouden werden.

**) Indien op chemotactische werking onderzocht, zouden aethylacetaat, Na-succinaat en Na-citraat waarschijnlijk ook geen effect vertoond hebben. Vgl. § 3.2. van dit hoofdstuk.

Na-azide remde ook in de concentratie 10^{-2} molair niet waarneembaar.

Na-oleaat, door ons niet onderzocht op chemotactische eigenschappen, maar door Pringsheim en Mainx (3) in hun experimenten als een heel goed chemotacticum bevonden (Vgl. § 3.2.), gaf een remming van de respiratie met concentraties 10^{-2} en 10^{-3} molair en had geen waarneembare invloed met 10^{-4} en 10^{-5} molair.

Citroenzuur remde de respiratie in de concentratie 10^{-1} mol, misschien door de hierdoor ontstanelage pH van het suspensiemedium en/of door complexbinding van Ca^{++} en andere ionen.

3.1.5. Discussie

De in de paragrafen 3.1.1., 3.1.2. en 3.1.3. genoemde resultaten mogen als een steun voor de bruikbaarheid van onze hypothese over de samenhang tussen chemotaxis en een plotselinge verandering in het metabolisme (zoals geformuleerd in hoofdstuk I) beschouwd worden. De gegevens van de laatste paragraaf zijn afkomstig van enige, tamelijk willekeurig gekozen, oriënterende proeven. Zij dienen uiteraard systematisch aangevuld en uitgebreid te worden, alvorens er op verantwoorde wijze conclusies uit getrokken kunnen worden.

3.2. De chemotaxis-proeven van Pringsheim en Mainx (3)

Deze auteurs onderzochten een groot aantal stoffen op hun werking bij *Polytoma uvella* Ehrb; met het doel verband tussen chemische structuur en chemotactische werking te leggen. Vele stoffen bleken positief chemotactisch te werken; organische zuren (eenbasische verzadigde-, idem onverzadigde-, hydroxy-, halogeen-, en aromatische-) alcoholen, esters, aldehyden, ketonen en koolwaterstoffen. Niet chemotactisch werkten meerbasische zuren, meerwaardige alcoholen, aether, suikers en enkele onderzochte heterocyclische verbindingen. De auteurs beklemtoonden de noodzaak van uiterst schoon glaswerk en het gebruik van verse oplossingen, daar water en glas uit de lucht chemotactisch actieve stoffen opnemen. Zij geven op enkele plaatsen aan, dat de onderzochte stoffen niet eerst nog eens gezuiverd waren. Dit maakt, dat bijv. de gevonden regel, volgens welke vetzuren meer dan ketonen en deze weer meer dan aldehyden en alcoholen chemotactica zijn, aan waarde inboet. Ook wij vonden, dat vetzuren meer dan de overeenkomstige alcoholen chemotactisch "aanlokken". Maar daarnaast bereidden wij bijv. ons $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$ -zuur door destillatie van het beschikbare, kennelijk zeer onzuivere overeenkomstige aldehyde met een behoorlijke opbrengst (ca 30%) hetgeen er op wijst, dat de genoemde regel niet zonder experimenten met zuivere stoffen gehandhaafd kan worden.

Bepaalde stoffen kunnen in zoveel kleinere concentraties dan andere stoffen chemotactisch werken bij een bepaald organisme, dat regels opstellen pas zin krijgt, als de verontreinigingen geen chemotactische werking hebben, of wanneer de eigenschappen ervan bekend zijn. Door het feit, dat bijv. de vrije vetzuren en de natriumzouten ervan opgelost in leidingwater, een even sterke werking hebben, besluiten Pringsheim en

Mainx tot de regel, dat de dissociatiegraad voor de chemotactische werking onbelangrijk is. Echter zal bijv. een 10^{-3} mol oplossing van natrium-acetaat (ca 0,008%), die goed chemotactisch werkt in hun medium (hard leidingwater (vgl. (3) pag. 595), practisch evenveel kationen blijven behouden, als een 10^{-3} mol oplossing van het vrije zuur, en dus ook ongeveer evenveel acetaat-ionen. Bovendien zijn verschillen in "drempelconcentraties" van de grootte-orde van ca 5 nauwelijks te meten. Bij de mededeling, dat esters minder chemotactisch zijn dan de vrije zuren, dringt zich de gedachte op, dat de meestal aanwezige onbekende percentages vrij zuur en vrije alcohol verantwoordelijk gesteld zouden kunnen worden voor de waargenomen chemotactische werking. Pringsheim en Mainx onderzochten de natriumzouten van de gewone vetzuren $C_nH_{2n}O_2$ (met $n = 1$ tot 10, 16 en 18). Voor de laagste concentratie, die chemotactisch aantrekt (drempelwaarde) van de natriumzouten van palmitinezuur en stearinezuur, opgelost in leidingwater, vinden zij 2.10^{-4} mol. Deze zepen lossen evenwel practisch niet op bij kamertemperatuur in water (25). Daarnaast kregen wij met vetzuren van meer dan 10 C-atomen (onderzocht werden $n = 10$ 13) tot een verdunning van 10^{-3} mol slechts bijna heldere oplossingen als aq. dest. het oplosmiddel was. Werd deze lage concentratie nu verder 10 x verdund met ons, evenals dat van Pringsheim en Mainx, harde leidingwater, dan ontstond er geen zichtbaar neerslag meer.

Pringsheim en Mainx maakten hun zeepoplossingen door een geconcentreerde warme oplossing te gieten in een berekende hoeveelheid water van kamertemperatuur. Dat zij toch een chemotactische ophoping rapporteerden, is misschien aan de hand van onze eigen proeven toe te schrijven aan een mechanische valwerking.

Brachten we bijv. 10^{-2} mol van het natriumzout van het vetzuur $C_{13}H_{26}O_2$, opgelost in aq. dest., in de capillair en werd de capillair dan gestoken in de suspensie van *Polytoma*'s in leidingwater, dan zagen we enkele seconden later een bewegingloze prop (calciumzout ?) in de mond van de capillair, waarin verscheidene *Polytoma*'s gevangen zaten. Chemotaxisproeven met vetzuren $C_2H_{2n}O_2$ ($n > 10$) kunnen dus slechts gedaan worden met organismen, die eveneens in aq. dest. bewegen (hoofdstuk IV).

Pringsheim en Mainx beschrijven, hoe een min of meer scherp niveau van bewegende *Polytoma*'s in een cultuurbuis, waar het voedsel langzaam uit een laag aarde op de bodem omhoog diffundeert, zich kan splitsen in twee niveau's. Zulk een zich splitsen van een niveau in een ophopingscultuur, of van een wolk van protisten in bijv. een capillair met chemotacticum is reeds herhaaldelijk beschreven (3, 20, 22). Wij vonden bijv. eens, dat met 10^{-2} mol Na-valeraat in de capillair en een bepaalde suspensie *Polytoma*'s in de druppel er na ca 1/2 min. een ophoping van *Polytoma*'s in de capillair (0,2 mm diam.) ontstond. Na 2 min waren er twee ophopingen: de eerste, 0,3 mm in de capillair gedrongen en 0,6 mm langen de tweede 5 mm in de capillair gedrongen en 0,7 mm lang.

Na 5 min was de tweede ophoping verdwenen en waren de *Polytoma*'s in het achterste deel van de capillair gelijk verdeeld. Een ander maal waren de beide ophopingen na 30 min nog aanwezig en pas na 50 min was de tweede ophoping verdwenen.

De leeftijd en de dichtheid van de suspensie speelden hierbij waarschijnlijk een rol. Vermoedelijk zijn er, als de splitsing zich eenmaal voltrokken heeft, dan twee plaatsen, waar het metabolisme belangrijk hoger is dan elders in de capillair of buis, zodat de organismen zich dan daar chemotactisch ophopen.

In een ophopingscultuur als boven beschreven, mogen we misschien bij benadering stellen, dat f' acetaat f'' O_2 dan maximaal is, als we aannemen, dat de oxydatie van acetaat de voornaamste energieleverende reactie is. Dan zijn dus zowel "chemotaxis" als "aerotaxis" (t. o. v. O_2 en misschien ook CO_2) in het geding.

Terecht wees Pringsheim op het gecompliceerde karakter van de aero-

taxis (22). Echter dat "geotaxis" bij de niveausplitsing in een cultuur-buis een rol zou spelen, zoals Pringsheim en Mainx aanvoerden, lijkt ons onwaarschijnlijk en zeker niet bewezen. Hetzelfde bezwaar tegen het aannemen van "geotaxis" hebben we tegen (20) en (21). "Geotaxis" is nog niet los van "aerotaxis" aangetoond, in tegenstelling met bijv. geotropisme bij hogere planten. In 1923 vermeldde Pringsheim zes verschillende chemotactische "sensibiliteiten" voor *Polytoma uvella*: voor vetzuren, O_2 , NH_4^+ , K^+ , $Na_2S_2O_3$ en extreme p_H 's (20).

In 1924 vermeldde hij er weer zes, maar i. p. v. K^+ en extreme p_H 's CO_2 en Ca^{++} (8). Pringsheim en Mainx besloten in 1926 tot de aanwezigheid van acht verschillende sensibiliteiten: voor alifatische verbindingen, aromatische verbindingen, O_2 , NH_4^+ , Ca^{++} , $Na_2S_2O_3$, zuren en basen (3). (De „chemotaxis" door $Na_2S_2O_3$ zou wel eens een taxis door verlaging van de redoxpotentiaal, dus "redotaxis" kunnen zijn).

Pringsheim en Mainx vermeldden niet waarom bepaalde sensibiliteiten uit de opgaven verdwenen en andere toegevoegd werden. Wij wezen er reeds op, dat het onderzoek naar sensibiliteiten voor onze algemene hypothese en het bewijzen ervan, ons in eerste instantie minder urgent leek. Vgl. hoofdstuk I en (22).

Uit eerder werk van Pringsheim blijkt, dat *Polytoma uvella* bij extreme p_H 's van de suspensie (omstreeks 4 en 11) zijn chemotactisch vermogen verliest en bij nog extremere p_H 's zijn beweeglijkheid (8). Oplossingen van zuren en basen met $p_H < ca\ 4$ en $> ca\ 11$ in de capillair gaven alleen negatieve chemotaxis te zien (20). Pringsheim en Mainx vonden met hun suspensie van jonge zwermers, die juist uit het palmellastadium gekomen waren en verder niet gegroeid, voor de normale vetzuren $C_nH_{2n}O_2$ de volgende drempelconcentraties: voor $n = 1 : 10^{-3}$ mol; $n = 2 : 10^{-5}$ mol; $n = 3 : 10^{-5}$ mol; $n = 4 : 10^{-7}$ mol; $n = 5 : 10^{-6}$ mol; $n = 6 : 10^{-6}$ mol; $n = 7 : 10^{-6}$ mol; $n = 8 : 10^{-5}$ mol; (meestal als natriumzout gemeten). Dus bij $n = 4$ (boterzuur) zou een maximale chemotactische gevoeligheid aanwezig zijn bij de jonge zwermers. Voor de normale alcoholen $C_nH_{2n+1}OH$ vonden zij voor $n = 1 : 10^0$ mol; $n = 2 : 10^{-2}$ mol; $n = 3 : 10^{-4}$ mol; $n = 4 : 10^{-5}$ mol; $n = 5 : 10^{-3}$ mol; $n = 7 : 10^{-2}$ mol. Dus ook hier weer een maximale gevoeligheid voor $n = 4$. (Wij herinneren eraan, dat wij daarentegen met volwassen zwermers van dezelfde (?) *Polytoma uvella* stam de proeven deden (hoofdstuk IV)).

Wij vonden voor de vetzuren voor $n = 2$ tot $8 : 10^{-4}$ en voor $n = 9 : 10^{-3}$ mol. We vonden voor de alcoholen met $n = 1$ tot $4 : 10^{-1}$ mol.

De alcoholen met $n = 5$ tot 8 zijn pas bij 10^{-2} mol oplosbaar in leidingwater. In deze concentratie waren ze niet actief in ons geval. Of alleen de leeftijd de oorzaak was van de verschillen in concentratie, gingen we niet na. Dit was niet direct voor ons belangrijk. We vermelden het echter als voorbeeld van hoe-voorzichtig men moet zijn met het vergelijken van en conclusies trekken uit de getallen, die door verschillende onderzoekers voor een bepaald organisme opgegeven worden.

3. 3. Een „verdunningseffect" bij *Polytoma uvella*

Het bewegingsapparaat van *Polytoma uvella* bleek dus gevoelig te zijn voor soms heel kleine concentraties van chemotacticum (3, 20) en par. 3. 1. van dit hoofdstuk) en voor schudden (hoofdstuk III). Een verdere aanwijzing voor de bijzondere gevoeligheid van het bewegingsapparaat is ook het feit, dat, als bijv. 1 ml van een suspensie van goed bewegende Polyto-

ma's in leidingwater verdund wordt met 1 ml leidingwater zonder organismen, de beweging na enkele minuten meestal ophoudt. Alleen bij heel dichte suspensies blijft de beweging behouden. Dit effect namen we herhaaldelijk waar. Het gaat misschien gepaard met een verlaging van de respiratie. De oorzaak hebben we niet verder bestudeerd.

Bij onze Warburgmetingen (0.3 ml chemotacticum-oplossing wordt gevoegd bij 2.7 ml suspensie) stoorde het effect niet merkbaar. In hoeverre het effect bij de chemotaxisproeven stoorde, weten we niet, maar we vermoeden, dat het zeer gering is.

3. 4. Theoretische beperkingen van de tweede hypothese

Het is nodig, dat er een voldoende aantal stoffen onderzocht wordt op hun werking als chemotacticum en als stimulans (resp. remmer) van het metabolisme van bepaalde protisten. Er kunnen zich nl. waarschijnlijk uitzonderingen voordoen:

- a) met stoffen, die wel de respiratie verhogen, maar niet chemotactische werken, omdat ze de brandstoftoevoer in het bewegingsapparaat niet verhogen.
 - b) met stoffen, die de respiratie verhogen en gelijktijdig zelfs de brandstoftoevoer in het bewegingsapparaat verlagen.
 - c) met stoffen, die in een bepaalde concentratie de respiratie niet beïnvloeden, maar wel de toevoer van brandstof in het bewegingsapparaat verhogen en dus chemotactisch werken.
- ad a). Een voorbeeld mogen we wellicht zien in *Chlamydomonas moewusii*. Dit is een photo-autotrooph organisme, dat in het donker organische stoffen (glucose, azijnzuur, barnsteen-zuur, pyrodruivenzuur) kan opnemen en oxyderen. Dit bleek uit een verhoogde zuurstofopname in een Warburgapparaat. Echter de vrijkomende energie van het metabolische proces kan niet voor de groei gebruikt worden (9). Hoe het met de beweeglijkheid gesteld was, wordt niet vermeld, maar zowel beweeglijkheid als groei zijn energiebehoefte processen.
- ad b). Dinitrophenol verhoogt de zuurstofopnamen van plant-aardige- en dierlijke weefsels, maar verbreekt gelijktijdig de schakel tussen de energieleverende en energievragende processen (10, 11).
- ad c). We kunnen ons voorstellen, dat bijv. een bepaalde narcoticum-concentratie selectief het ene energieverbruikende enzymcomplex remt en het andere daardoor indirect stimuleert door de grotere beschikbare hoeveelheid energierijke brandstof, zonder dat het energieleverende systeem al beïnvloed wordt. Vgl. hoofdstuk I.

3. 5. Beperkingen van de mogelijkheden van het Warburgapparaat voor ons onderzoek

Het Warburgapparaat zoals wij er één gebruikten, is een betrekkelijk grof instrument. Al zien de eerste resultaten (§ 3.1) er hoopvol uit, het is van te voren nog niet geheel zeker, of

de voorspelde verhoging van het metabolisme en dus van de zuurstofopname onder invloed van chemotactica met dit apparaat in een overtuigend aantal gevallen aan te tonen is. Bij positieve phobochemotaxis komt het organisme toevallig in een bepaalde hogere concentratie van chemotacticum. Pas bij het verlaten van de „chemische val” treedt de schrikreactie op: eerst wordt de beweging gestaakt en daarna worden de meer of minder gecompliceerde verdere onderdelen van de schrikreactie uitgevoerd met als gevolg, dat de protist in de hogere concentratie gevangen blijft (hoofdstuk I).

Met het Warburgapparaat is het ogenblik, dat de protist in de hogere concentratie van het chemotacticum komt, eenvoudiger na te bootsen dan het ogenblik, dat hij weer in de veel lagere concentratie komt. En bij deze laatste treedt juist de karakteristieke schrikreactie op. Bij negatieve phobochemotaxis is de mogelijkheid tot correleren eenvoudiger. De benodigde tijd voor het weer instellen van de temperatuur, nadat de chemotacticum buiten de thermostaat bij de suspensie gevoegd is, maakt, dat een verandering in het metabolisme onmiddellijk na het mengen moeilijk te volgen is. Weatherley (13) en Specht (14) wijzen erop, dat sommige protozoa behalve CO_2 ook NH_3 ontwikkelen. Jahn oppert de mogelijkheid van H_2 en CH_4 ontwikkeling door protozoa (12).

Een oplossing voor de genoemde problemen en de gevoeligheid voor schudden (hoofdstuk III) en verdunnen (par. 3.3) is misschien om een gaskamer i. p. v. een Warburgapparatuur te gebruiken. We denken hierbij aan de constructie van De Robertis en Peluffo, die aan dit doel zou kunnen worden aangepast (7). Vgl. ook (8). Hierbij zou dan een vluchtig chemotacticum gebruikt moeten worden, wat wel een beperking is. De doorstromende gasstroom zou dan voortdurend voor en achter de meetkamer op O_2 -, N_2 -, CO_2 -, NH_3 - en misschien nog andere gehalten geanalyseerd moeten worden; bijv. met een massa-spectrograaf of infraroodspectrophotometer.

3. 6. Algemene opmerkingen en suggesties

Bij toekomstige proeven verdient het aanbeveling een buffer aan het suspensiemedium (leidingwater) toe te voegen, daar bij eventueel te zeer afwijkende pH's de chemotaxis verdwijnt en wellicht de respiratie beïnvloed wordt. (vgl. par. 3.1.4., citroenzuur). Het zal niet voor alle chemotaxis- en respiratiemetingen nodig zijn om de Polytoma's in een medium zonder koolstofbron te brengen. Wij deden het, om in eerste instantie de proeven van Fringsheim en Mainx beter te kunnen beoordelen, al moesten we ook op praktische gronden de suspensie anders bereiden (hoofdstuk IV). Chemotaxisproeven met bacteriën werden reeds veelal in een verdund voedingsmedium uitgevoerd, omdat ze anders niet beweeglijk te houden waren (8).

Met het oog op de gevoeligheid van Polytoma uvella voor

schudden, verdunnen van het medium enz. kunnen andere proeforganismen (bacteriën) wel eens aantrekkelijker blijken om de algemeen opgestelde hypothese verder te gaan toetsen. Allerlei physiologische belangrijke stoffen zouden onderzocht kunnen worden, zowel homologe reeksen als ook alleenstaande verbindingen, waarvan vroegere onderzoekers vaststelden, dat ze chemotactisch actief waren. Daarnaast kan men voedingsstoffen met niet-voedingsstoffen vergelijken, ergonen met anti-ergonen enz. enz. We noemen enkele voorbeelden, die ons zelf interessant lijken en verwijzen verder naar Hoofdstuk I en de literatuur (3, 8, 22).

Glycerol was geen chemotacticum voor de door Pfeffer onderzochte bacteriën, ofschoon het wel een goede C-bron kon zijn (23). Misschien gebruikten zijn bacteriën in geval van keuze alleen de suikers uit het (verdunde) medium, waarin ze gesuspendeerd waren. Warburgproeven zouden hier opheldering kunnen verschaffen. Voor een andere verklaring zie hoofdstuk I.

Saprolegnia-zoösporen zijn, zodra ze het sporangium verlaten, niet chemotactisch op te hopen. Nadat ze eerst tot rust zijn gekomen, weer uitgekiemd en in beweging gekomen (zelfs sneller dan in het eerste zwermstadium), zijn ze wel chemotactisch op te hopen; nl. met PO_4^{---} , lecithine, azijnzuur en wijnsteenzuur (Stange (1)). Hier is het interessant de chemotaxis en de beïnvloeding van de respiratie in beide stadia met de genoemde stoffen, en eventueel nog andere, na te gaan.

Bij de archegoniaten duiden de verschillende, vaak heel specifieke, chemotactica voor de spermatozoiden misschien op interessante verschillen in de biochemie van de verschillende vertegenwoordigers. Zo bleek bijv. het enige chemotacticum voor de spermatozoiden van bladmossen rietsuiker te zijn (Pfeffer (23)) en de enige organische chemotactica voor de spermatozoiden van *Marchantia polymorpha* (een levermos) waren volgens Lidforss enkele eiwitten (2, vgl. 5).

Bij de vaatcryptogamen is appelzuur vaak een goed chemotacticum naast soms fumaarzuur (*Isoëtes*), maleinezuur (*Salvinia*) en wijnsteenzuur (*Equisetum*) (2, 15, 23). Appelzuur is geen chemotacticum voor *Lycopodium* (waarvoor Bruckmann citroenzuur aanwees) en voor *Marsilia* (2). ¹⁾

4. Samenvatting

1. Er werd een begin gemaakt met het verzamelen van experimentele gegevens ter toetsing van de opgestelde hypothese over de phobo-chemotaxis (vgl. hoofdstuk I).

1) De waarschijnlijk kleine hoeveelheden beschikbare spermatozoiden zullen het meten met gevoelige micro-respirometers nodig maken.

- Gebruik werd gemaakt van een uit de eerste voortvloeiende tweede hypothese, nl. dat waarschijnlijk verscheidene (de meeste?) stoffen, die een bepaalde protist phobochemotactisch kunnen „aanlokken“ (positieve phobochemotaxis), het metabolisme direct of indirect (bijv. door een vergroting van het vermogen om de energie leverende stof uit het metabolische proces in de cel te distribueren) plotseling en reversibel kunnen versnellen. Een versnelling van het metabolische proces zal zich bij aerobe organismen uiten in een grotere zuurstofopname per min.
2. Chemotaxis- en respiratiemetingen werden verricht aan dezelfde suspensie van *Polytoma uvella*. Een correlatie tussen chemotactische werking en onmiddelijk hogere zuurstofopname werd gevonden in de gevallen van azijnzuur, boterzuur (beide zijn goede C-bronnen voor *Polytoma uvella*), methanol, aethanol, propanol (geen C-bronnen) en di-n-amylazijnzuur, (geschiktheid als C-bron onbekend).
 3. De plantengroeistof, α -naphtylazijnzuur en de plantengroeistof-synergist, di-n-amylzijnzuur bleken in zeer lage concentraties chemotactisch op *Polytoma uvella* te werken.
 4. Een „verdunningseffect“, in zichtbare uitwerking gelijk aan het „schudeffect“, werd gevonden.
 5. De proeven van Pringsheim en Mainx over de chemotaxis van *Polytoma uvella* werden, gedeeltelijk aan de hand van eigen proeven, besproken.
 6. De mogelijkheden om de hypothese voor de phobochemotaxis verder te toetsen werden besproken.

5. Literatuur

1. Stange, B. ; Bot. Zeitung, 48, 107 (1891).
2. Lidforss, B. ; Jahrb. wiss. Bot. 41, 65 (1905).
3. Pringsheim, E. G. en Mainx, F.; Planta 1, 621 (1926).
4. Umbreit, W. W., Burris, R. H. en Stauffer, J. F.; *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*, Burgess Publ. Co. Minneapolis. Minn. (1951).
5. Åkerman, Å. ; Z. Bot. 2, 94 (1910).
6. Hall, R. H. ; Biol. Bull. 75, 395 (1938).
7. De Robertis, R. en Peluffo, C. A.; Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 78, 584, (1951).
8. Pringsheim, E. G.; Adberhaldens Hand. Biol. Arbeitsm. 12, (2), 307 (1924).
9. Hutner, S. H. en Provasoli, L.; *The Phytoflagellates in Lwoff, A, (ed.). Biochemistry and Physiology of Ptotozoa I*, Acad. Press New York (1951).
10. Bonner, J. en Millerd, A.; Arch. Biochem. Biophys. 42, 135 (1953).

11. Loomis, W. F. en Lipmann, F.; J. Biol. Chem. 173, 807 (1948).
12. Jahn, T. L. ; Hoofdst. 6 in Calkins, G. N. and Summers; F. M. (eds.) Protozoa in Biol. Research Columbia Univ. Press New York (1941).
13. Weatherley, J. H.; Physiol; Zool. 2, 375, (1929).
14. Specht, H. ; J. Cell. Comp. Physiol. 5, 321 (1935).
15. Shibata, K. ; Jahrb. wiss. Bot. 41, 561 (1905).
Jahrb. wiss. Bot. 49, 1 (1911).
16. Links, J. en Groot, M. S. de; Rev. trav. chim. 72, 57 (1953).
17. Jacobson, H. C. ; Z. Bot. 2, 145 (1910).
18. Francé, R. ; Jahrb. wiss. Bot. 26, 295 (1894).
19. Fritsch, F. E. ; The Structure and Reproduction of Algae I. Cambridge Univ. Press (1935).
20. Pringsheim, E. G.; Beitr. allgem. Bot. 2, 88 (1923).
21. Pringsheim, E. G.; Planta, 26, 665 (1937).
22. Pringsheim, E. G.; Die Reizbewegungen der Pflanzen Verlag J. Springer, Berlin (1912).
23. Pfeffer, W. ; Untersuch. a. d. botan. Inst. z. Tuebingen 1, 363 (1884) en 2, 583 (1888).
24. Veldstra, H. en Booij, H. L.; Biochem. Biophys. Acta 3, 278 (1949).
25. McBain J. W. en Siericks, W. C.; J. Am. Oil. Chem Soc. 25, 221 (1948).
26. Burstrom, H. ; Phys. Plant. 2, 197 en 332 (1949).
27. Bruchmann, H. ; Flora, 99, 193 (1909).
28. Bonner, J. ; Plant. Biochemistry, Acad. Press, New York (N. Y.) (1950).

Hoofdstuk III

DE NADELIGE INVLOED VAN SCHUDDEN OP DE RESPIRATIE VAN POLYTOMA UVELLA EN EEN HYPOTHESE OVER DE THIGMOTAXIS VAN PROTISTEN

1. Inleiding

Bij onze oriënterende proeven met *Polytoma uvella* in het Warburgapparaat (Hoofdstuk II) viel het op, dat, onder overigens gelijke omstandigheden, bij verhoging van de schudsnelheid, afhankelijk van de concentratie aan organismen en de beginfrequentie van de beide horizontale schudmechanismen, een verhoging, of een verlaging van de opgenomen hoeveelheid zuurstof per uur verkregen werd.

De verhoging van de zuurstof-opname in een Warburgrespirometer door verhoging van de schudsnelheid kan optreden, doordat de snelheid van de zuurstofopname uit de gasphase in de vloeistofphase verhoogd wordt. Tenslotte is hij dan niet meer het langzaamste proces, zodat we dus inderdaad de potentiële opname door het onderzochte materiaal onder de gegeven omstandigheden gaan meten (17). Voerden wij bijv. de schudfrequentie op van ~ 40 tot ~ 80 per min., dan nam bij een dichte suspensie van goed beweeglijke *Polytoma*'s (in leidingwater *) de opgenomen hoeveelheid zuurstof per uur soms met meer dan 100 procent toe (kamertemperatuur, totale volume van gas- en vloeistofphase ~ 9 ml).

De verlaging van de zuurstofopname in een Warburgrespirometer door verhoging van de schudsnelheid trad op, als met een niette dichte suspensie van *Polytoma*'s de schudfrequentie van 40 à 60 op ~ 90 per min. gebracht wordt. Dit duidt op een directe schadelijke beïnvloeding van de respiratie door schudden.

*) Voor het verkrijgen van de *Polytoma*-suspensie in leidingwater, vergelijk men hoofdstuk IV.

2. Discussie

2. 1. Algemeen gedeelte

Dat door stoten de ademhaling van protisten verlaagd wordt en dat dit met een gewoon Warburgapparaat gemeten kan worden, vonden we niet eerder vermeld in de literatuur. De meeste manometrische proeven met protisten zijn met ongevoelige (?) gisten en bacteriën verricht en in veel mindere mate met protozoa en eencellige algen. Waarschijnlijk kan het besproken effect nog scherper worden waargenomen, als men de ademhaling van morphologisch ingewikkelder protisten, zoals bijv. *Paramaecium* zou onderzoeken. Wel heeft men reeds lang geleden verscheidene gevallen vermeld, waar men door schudden gedurende meerdere dagen de groei van bacteriën en gisten kon beïnvloeden. Zowel gunstige (2.3), als ongunstige effecten (3,5,6) werden gevonden. De gunstige effecten waren waarschijnlijk meestal te wijten aan een betere aëring (3). In één geval schijnt door een directe mechanische invloed op micro-organismen een verbetering van de groei tot stand gebracht te zijn (4).

Voor andere eigen waarnemingen over de schadelijke invloed van schokken op *Polytomauvella* verwijzen we naar § 2.4 van hoofdstuk IV. Hiermede samenhangend is ook het feit, dat, als een cultuur met goed groeiende en bewegende *Polytoma*'s (op een vloeibaar medium) even geschud wordt, de organismen hun beweging staken en bezinken. Laat men de buis verder met rust, dan herstelt zich de beweging en de *Polytoma*'s verzamelen zich weer (aërotactisch) onder de meniscus (1).

2. 2. De *phobothigmotaxis*

Vele zelfbewegende protisten vertonen een min of meer gecompliceerde actieve omkeerbeweging (schrikreactie), als ze tegen een vast voorwerp zwemmen en zo dus een stoot ontvangen. Vergelijk Pfeffer 1904 (12), Metzner 1920 (10), Pütter 1900 (13) en Jennings 1914 (15). Ook *Polytoma uvella* kan waarschijnlijk thigmotactisch reageren; wij ondernamen hier zelf geen speciale proeven. Verscheidene nauw verwante flagellaten, zoals bijv. *Chlamydomonas pulvisculus* vertonen het verschijnsel (12).

Pütter nam waar, dat bij ciliaten en flagellaten de eerste phase van de thigmotactische reactie een vertraging van de ciliën (flagellen-) -activiteit is (13). Hierna zwemt het organisme tijdelijk terug (goed te zien bij *Paramaecium*) en/of verandert de richting van de lichaamsas om in de nieuwe richting weer vooruit te gaan (15). Alleen sommige bacteriën, zoals de amphitriche spirillen blijven als reactie op een „prikkel” in hun teruggaande beweging volharden (10).

De zichtbare thigmotactische vluchtreactie bleek bij nauwkeuriger waarnemen in verscheidene gevallen gelijk te zijn aan de reactie bij phobochemotaxis. Vergelijk hoofdstuk I. We zouden dan ook in de meeste gevallen mogen spreken van phobo-thigmotaxis.

Wij concluderen nu uit

- a) de waarnemingen van anderen en van ons zelf over de invloed van schudden op protisten,
- b) de door verscheidene onderzoekers geconstateerde sterke overeenkomst tussen de zichtbare reactie bij thigmotaxis en (negatieve) phobo-chemotaxis.
- c) onze hypothese over de phobo-chemotaxis (hoofdstuk I).

Dat bij de verschillende gevallen van phobothigmotaxis aan de eigenlijke schrikreactie een plotselinge (zeer snelle) verlangzaming van de metabolische processen in het organisme voorafgaat en dus/of een verlaging van de toevoer (of het gebruik) van energieleverende stoffen in het motorische apparaat.

Bij de phobo-chemotactische ciliaten en flagellaten plant de schok zich waarschijnlijk meestal snel door het hele lichaam voort en/of zorgen dezelfde regulerende systemen als bij de phobo-chemotaxis voor de uniforme reactie. We denken hierbij bijv. aan het „neuromotorisch apparaat“ bij *Paramecium* (7, 8, 9) en aan de samenhangende structuren van flagellen, blepharoblast, rhizoplast en centrosoom bij de flagellaten (11, 16).

2. 3. De *topothigmotaxis*

Topothigmotaxis (negatieve-) is (o.i.) alleen voor de spermatozoiden van de varen *Adiantum cuneatum* waarschijnlijk gemaakt (Metzner 1923 (14)). Bij deze organismen worden alleen de aangestoten („geprikkelde“) ciliën vertraagd in hun beweging (niet mechanisch geremd). Waarschijnlijk ten gevolge van de verende spiraalstructuur, heeft er geen voortplanting van een voldoende sterke schok door het hele organisme plaats en is er ook op andere wijze geen „prikkelgeleiding“ naar de overige ciliën zoals bij de phobothigmotactisch reagerende organismen. Met een aangenomen „reactietijd“ (= tijd tussen het aanstoten en de vertraging van de ciliënslag) van ongeveer de helft van de rotatietijd (van de spermatozoid) is zo inderdaad een negatieve topo-thigmotaxis te begrijpen (Metzner (14)).

3. Samenvatting

1. We vonden, dat de ademhaling van *Polytoma uvella* door schudden verlaagd kan worden.

2. Door schudden kan een reversibele beschadiging van *Polytoma uvella* ontstaan. Als de beschadiging niet te groot is, kan hij onder bepaalde omstandigheden opgeheven worden door actieve processen in de cel, die gevoed worden door het reserve voedsel in het organisme. Bij ergere beschadiging is waarschijnlijk een toevoer van substraat (acetaat) uit het medium nodig.
3. Een hypothese over de thigmotaxis (phobo-) wordt gegeven.

4. Literatuur

1. Pringsheim, E. G. ; Beitr. allg. Bot. 2, 106 (1923).
2. Russel, H. L. ; Bot. Gaz. 17, 1 (1892).
3. Meltzer, S. J. ; Z. Biol. 30, 464 (1894).
4. Mudge, C. S. en Smith, F. R. ; Proc. Soc. Exp. Biol. 31, 154 (1933).
5. Verworn, C. ; Allgemeine Physiologie, Jena (1909).
6. Kondrat'eva, T. M. ; Bull. Acad. Sci. U. R. S. S. 653 (1943-1935).
Aangehaald in Coult, D. A.; Proto-
plasma 32, 92 (1939).
7. Kalmus, H. ; Paramecium, Verlag Fischer, G, Jena (1931).
8. Taylor, C. V. ; Fibrillar Systems in Ciliates, Hfdst. IV in Calkins, G. N. en Summers, F. M. (red.) Protozoa in Biol. Research. Columbia Univ. Press. New York (1941).
9. Rees, C. W. ; Univ. Calif. Publ. Zool. 20, 333 (1922).
10. Metzner, P. ; Jahrb. wiss. Bot. 59, 325 (1920).
11. Kudo, R. R. ; Handbook of Protozoology 3 ed. Thomas, C. C. Springfield, Illinois (1940).
12. Pfeffer, W. ; Pflanzenphysiologie II, 2 Aufl., Leipzig (1904).
13. Pütter, A. ; Arch. An. und Physiologie, Physiol. Abt. Suppl. 342 (1900).
14. Metzner, P. ; Beitr. allg. Bot. 2, 486 (1923).
15. Jennings, M. S. ; Die niederen Organismen, ihre Reizphysiologie und Psychologie. Übers. von Mangold, E. Verlag Teubner, B. G. Leipzig und Berlin (1914).
16. Fritsch, F. E. ; Structure and Reproduction of Algae I. Univ. Press. Cambridge (1948).
17. Umbreit, W. W. ; Manometric techniques 2 ed. Burgess Publ. Co. Minneapolis, Minn. (1951).

Hoofdstuk IV

HET VERKRIJGEN VAN GOED BEWEGENDE POLYTOMA'S IN EEN MEDIUM ZONDER C- EN (OF) N- BRON

1. Inleiding

Om onze hypothese over de chemotaxis (hoofdstuk II) te kunnen bevestigen, en onze proeven met die van Pringsheim en Mainx althans gedeeltelijk te vergelijken, was het noodzakelijk goed bewegende *Polytoma*'s te verkrijgen in een medium zonder voedingsstoffen. Om de ademhaling van de organismen met de beschikbare apparatuur, nl. een Warburg-apparaat, te kunnen meten, was het bovendien nodig, dat de suspensie in dat medium behoorlijk geconcentreerd was.

Pringsheim en Mainx verkregen beweeglijke zwermers van *Polytoma uvella* door 7 dagen oude kolonies op agar (20°C) in leidingwater of een verdunde zoutoplossing (0,05% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,01% MgSO_4 , 0,02% K_2HPO_4) te suspenderen (2). De op agar in het palmellenstadium verkerende *Polytoma*'s vormden dan na minimaal één dag door deling en verlaten van het gemeenschappelijk omhulsel zeer snel bewegende, langgerekte zwermers, die veel kleiner zijn dan de volwassen (meer ronde) organismen ($\sim 1/3$). De zwermers bleven gedurende ongeveer een halve week beweeglijk in dit voedingsvrije milieu. De auteurs wezen op het goede reactievermogen van deze zwermers in chemotaxis-experimenten.

Wij konden dit bevestigen. De tijd van oogsten van de kolonies van de agar was afhankelijk van de dikte van de agarlaag en de dichtheid van enten (in hoopjes om grote koloniën te krijgen). Wij konden deze kleine zwermers ook verkrijgen uit de afgecentrifugeerde *Polytoma*'s van een één tot twee weken oude, *vloeibare* cultuur, als deze gesuspendeerd werden in leidingwater. Na ongeveer 4 dagen ontstonden dan ook hier zeer snel bewegende zwermers, die chemotactisch actief waren. De hoeveelheid zwermers was afhankelijk van de ouderdom van de cultuur en de aard van de suspensievloeistof. Deze methoden leverden ons een te kleine hoeveelheid bewegende organismen op voor de Warburg-apparatuur.

Wij gingen daarom na, of het mogelijk was de bewegende (volwassen) organismen uit een goed groeiende vloeibare cultuur over te brengen in b.v. leidingwater met behoud van de beweeglijkheid. We lieten het idee, om in navolging van

Pringsheim en Mainx chemotaxisproeven met de kleine, pas uitgekomen zwermers van *Polytoma uvella* te doen, dus bewust los ten gunste van betere meetmogelijkheden. Voor het zoeken naar het principe der chemotaxis maakte dit geen verschil, daar ook de volwassen organismen uitstekend chemotactisch bleken te reageren. Wel zullen de zogenaamde drempel-concentraties van de chemotactisch werkende verbindingen waarschijnlijk verschillend zijn door verschillen in snelheid, grootte en physiologie bij de kleine zwermers en de volwassen organismen (zie hoofdstuk II).

Ook dit is geen bezwaar voor het onderzoek. We besloten te trachten gebruik te maken van 1) filtreren, 2) de aerotaxis van *Polytoma uvella* of 3) centrifugerem.

2. Experimentele gegevens

2. 1. *Het overbrengen met behulp van filtratie*

Hierbij stootten we op het bezwaar, dat ook de fijnere papieroorten (Whatman I ($2,1\mu$), II ($1,6\mu$), 50 ($0,7\mu$) en 542 ($0,5\mu$), Schleicher en Schüll 573 en 589/3) het door ons gekweekte organisme ($\sim 12\mu \times 6\mu$) gedeeltelijk doorlieten.

2. 2. *Het overbrengen met behulp van aerotaxis*

Er werd gebruik gemaakt van een speciaal geconstrueerd glazen apparaatje, waarvan het hoofdbestanddeel een ronde glazen cel (inwendige $\emptyset$ 7 mm en uitwendige $\emptyset$ 10 mm) was, die uit twee delen bestond. Ieder der delen was zodanig in een, van een ingeboord gat voorzien, objectglaasje gekit (met araldit-hars), dat ze, of verticaal in elkaars verlengde konden liggen en dus één doorlopende cel vormden, of door verschuiven der tegen elkaar geklemde, horizontaal liggende, matgeslepen objectglasjes twee gescheiden ruimten opleverden. Het onderste celdeel (4 cm lang) was onderaan dichtgesmolten en het bovenste deel (10 cm lang) was onder en boven open.

Het onderste deel werd gevuld met een goedgroeïende cultuur van (goed bewegende) *Polytoma*'s, welke cultuur met congorood gekleurd was, en het bovenste deel werd gevuld met leidingwater 1).

De p_H was van beide ongeveer 7,9. Nadat de beide delen door twee uur rustig staan met de omgeving in temperatuur-

1) Volgens opgave van de Leidse Duinwater Maatschappij was de samenstelling ten tijde van deze proeven: Cl 61 mg., Ca 117,5 mg., CaO 164,4 mg., SO₄ 83,4 mg., NO₃ 3,1 mg/l en FeO en H₂O afwezig. Tijdelijke hardheid 14,5, totale hardheid 20,5 in Duitse graden.

evenwicht gekomen waren, werden de celdelen voorzichtig boven elkaar geschoven, zodat een scheidingsvlak ontstond.

Inderdaad waren de *Polytoma*'s op deze wijze door aerotaxis uit hun roodgekleurde cultuurvloeistof te lokken. Er viel een zeer langzaam opstijgende geelwitte ring van bewegende *Polytoma*'s waar te nemen in de kleurloze bovenste celruimte.

Door gebruik te maken van een driedelige cel zou men kunnen corrigeren voor een geringe menging van de beide media op het grensvlak. We beperken ons tot één voorbeeld.

Met een 8 dagen oude vloeistofcultuur, die zwaar geënt was, verkregen we na 18 uur een enkele mm's dikke zone van goed bewegende *Polytoma*'s op $2\frac{1}{2}$ cm van het scheidingsvlak.

Het succes van deze methode was wisselend en afhankelijk van de ouderdom en de dichtheid van de gebruikte cultuur.

Deze voorzichtige methode, die wellicht bij andere experimenten bruikbaar zou kunnen blijken te zijn, werd verder niet gestandaardiseerd, daar centrifugeren eveneens bruikbaar bleek te zijn.

Daarbij konden grotere hoeveelheden *Polytoma*'s snel van het cultuurmedium in het leidingwater overgebracht worden met herstel van de beweeglijkheid.

2. 3. Het overbrengen met behulp van centrifugeren

Na verscheidene experimenten kwamen we tot de volgende conclusie:

Een goed groeiende *Polytoma*-cultuur is gedurende een kort tijdperk na het enten zodanig te centrifugeren en weer te suspenderen in leidingwater, dat de beweeglijkheid van practisch alle organismen binnen enkele uren hersteld wordt.

Twee factoren bleken van belang te zijn:

1) De centrifuge mag slechts langzaam op toeren komen (in 5 min. naar 1000 omw./min.), daar anders door het trillen en schokken een *beschadiging* der organismen ontstaat, die na opslippen in leidingwater tot uiting komt in een verlangzaamde minder rechtlijnige beweging met nu en dan stilhouden, terwijl een groter percentage totaal onbeweeglijk is, of door draaien en trillen-op-de-plaats niet vooruit komt; de *Polytoma*'s lijken "dronken".

2) De bestetijd voor het centrifugeren en het suspenderen in leidingwater, nadat de cultures eenmaal geënt zijn, moet experimenteel bepaald worden en valt geruime tijd, voordat de cultuur uitgegroeid is. Zo bleek een cultuur, groeiend in een medium, dat 0,2% NaAc, 0,2% asparagine, 0,02% K_2HPO_4 , 0,01% $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ en 0,02% Na_2CO_3 bevatte, 5 dagen na het enten (10 ml. van een 5 dagen oude cultuur per 125 ml nieuw medium in een 300 ml Erlenmeyer) gecentrifugeerd en opgeslibd in leidingwater te kunnen worden. Hierbij werd in enkele uren de beweeglijkheid in leidingwater hersteld.

De door ons gebruikte centrifuge kwam in 5 min. op 1000

omw./min. en werd 5 minuten op die stand gehouden. De bewerking werd herhaald om de Polytoma's te bevrijden van resten van het oorspronkelijke voedingsmedium. De oorspronkelijke cultuur vertoonde na ongeveer 20 dagen geen groei meer.

2. 4. Verdere waarnemingen bij centrifuge-proeven

De beschadiging der Polytoma's, die ontstaat door schokken bij onvoorzichtig centrifugeren en welke zichtbaar wordt na opslibben in leidingwater, (zie eerste voorwaarde), wordt hersteld, als de organismen in het oorspronkelijke, of een nieuw voedingsmedium worden opgeslibd. In dat geval is ook het aantal weer beweeglijk geworden organismen practisch gelijk aan dat in de oorspronkelijke cultuur en onafhankelijk van het tijdstip na het enten (zie tweede voorwaarde), mits de organismen in het oorspronkelijke medium ook nog beweeglijk zijn. Wanneer de centrifuge eenmaal rustig draait met 1000 omw./min., of zelfs hoger (2500 omw./min.) heeft langer centrifugeren dan 5 min. (b.v. 10 min.) practisch geen nadelige invloed meer.

Leidingwater kon vervangen worden door de "3-zouten"-oplossing (0,02% K_2HPO_4 , 0,01% $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,02 Na_2CO_3) en zelfs door aq. dest. Voor deze laatste vloeistoffen gingen we de juiste omstandigheden niet na. De pH moet tussen 7 en 8 liggen.

Het tijdstip, waarop de beweging weer begint na opslibben in leidingwater, varieerde. Zo herkregen 2 cultures (resp. 6 en 8 dagen oud en met 0,2% asparagine als N-bron) na opslibben in leidingwater onmiddellijk hun beweeglijkheid en behielden deze gedurende verscheidene dagen. In een andere (3 dagen oude) cultuur op asparagine trad daarentegen de beweeglijkheid pas na een nacht staan in. Interessant was in dit laatste geval, dat de ademhaling, zoals die in een Warburg-apparaat gemeten wordt, practisch nul was direct na het opslibben in leidingwater juist zo als de beweeglijkheid. Na 16 uur, toen dus de beweeglijkheid hersteld was, had de ademhaling een duidelijk meetbare waarde gekregen. De organismen vertoonden toen ook een duidelijk reactievermogen in de chemotaxisproeven (hoofdstuk II). Wachtten we met een cultuur, die 5 dagen na het enten voor ons doel geschikt bleek te zijn, nog 10 dagen langer, dan herstelde de beweeglijkheid zich niet in leidingwater, hoewel de organismen in de oorspronkelijke cultuur nog goed beweeglijk waren.

Het bleek nl., dat bij regelmatig werken de tijd van ongeveer 5 dagen na het enten reproduceerbaar was. Als 3 à 4 parallelseries aangehouden werden, konden we practisch iedere dag over beweeglijke Polytoma's in leidingwater beschikken.

De beweeglijkheid bleef in leidingwater verscheidene dagen behouden. De chemotactische gevoeligheid bleek hier evenals

bij de zwermers van *Polytoma uvella* constant te blijven (vgl. (2)).

Langzamerhand werden echter wel meer en meer cellen onbeweeglijk, terwijl ook de gemiddelde snelheid afnam. Ook de ademhaling per ml suspensie werd minder. Als we zo een suspensie 2 weken lieten staan, waren nog slechts heel enkele van de gesuspenderde *Polytoma*'s beweeglijk, terwijl daarnaast zeer snelle zwermers ontstaan waren uit de bewegingloze en bezonken organismen (vgl. Inleiding).

3. Discussie

Het blijkt uit dergelijke opslibproeven van hele cultures, welke, voor zover ons bekend is, nog niet eerder door andere onderzoekers zijn verricht, dat het goed mogelijk is om volwassen *Polytoma*'s snel van een vloeibaar medium in leidingwater over te brengen met volledig herstel van de beweeglijkheid.

Pringsheim en Mainx vermeldden in 1926 (pag. 591) slechts kort, dat één-week-oude cultures in vloeibaar medium, na afcentrifugeren en opnemen in leidingwater, goed zwermde (2). (Zij beoogden hiermede gameten- en zygotvorming te bewerkstelligen. Vergelijk in dit verband ook (4)).

Mainx vond in 1929 (pag. 113), dat als hij de phototactische phytoflagellaten, *Haematococcus pluvialis* en *Chlorogonium euchlorum* uit het voedingsmedium centrifugeerde en opnam in aq. dest., dat de algen direct na overbrengen slecht phototactisch reageerden en later met verschijnselen van beschadiging tot rust kwamen (3).

Gebauer deed in 1930 galvanotaxis-proeven met *Polytoma uvella*. Hij centrifugeerde zijn (niet steriele) ophopingscultures gedurende 2 min. ($g = 1000$) en bracht met een pipet de organismen over in leidingwater. Dit werd tweemaal herhaald. Hij vermeldde geen moeilijkheden (5).

In tegenstelling met zijn publicatie in 1926 wees Pringsheim in 1946 op de beschadigingen, die in het algemeen optreden, als (individuele) flagellaten en algenzwermosporen van een medium in leidingwater overgebracht worden (bij de "pipetteer- en wastechniek") (1).

4. Samenvatting

De omstandigheden werden beschreven, waaronder we *Polytoma uvella* uit een goed groeiende cultuur door middel van centrifugeren op een zodanige wijze konden concentreren en overbrengen in leidingwater (of een oplossing van zouten), dat de beweeglijkheid zich na enkele uren weer herstelde.

5. Literatuur

1. Pringsheim, E. G. ; Pure culture of algae. Univ. Press
Cambridge (1946).
2. Pringsheim, E. G. en ; Planta 1, 583 (1926).
Mainx, F.
3. Mainx, F. ; Arch. Protistenk. 68, 105 (1929)
4. Pringsheim, E. G. en ; Bot. Centr. Beihefte A, 59, 117
Ondratschek, K. (1939).
5. Gebauer, H. ; Beitr. Biol. Pfl. 18, 445 (1930).

Hoofdstuk V

ISOLERING VAN DE LIPOIDEN UIT POLYTOMA UVELLA EN ONDERZOEK VAN DE DAARIN AANWEZIGE CAROTENOIDEN *)

§ 1. Inleiding

In het algemeen zijn slechts weinig gegevens bekend over de chemische samenstelling en het metabolisme van de protozoa vergeleken met die van andere groepen in het rijk der niet-cellulaire organismen (protisten), zoals bijvoorbeeld de bacteriën. Lwoff somt als oorzaken hiervan op: de moeilijkheden om de protozoa in reïncultuur te brengen en te houden en de langzame groei, waardoor het verkrijgen van enkele grammen organismen veel meer inspanning vereist dan bij bacteriën en lagere schimmels (28).

Door onze onderzoeken over de chemotaxis van protisten (hoofdstukken I en II) hadden wij de beschikking over een protozoön in reïncultuur, nl. de phytoflagellaat *Polytoma uvella*. Dit gemakkelijk op eenvoudige media (hoofdstuk VII en (27)) (in reïncultuur) te kweken organisme vertoont een typische pigmentvorming, die toeneemt tijdens het bezinken en encystreren van de uit isogameten gevormde zygoöt (63). In 1926 toonde Pringsheim aan, dat de gekleurde stof een mengsel was van "carotenen" en "xanthophyllen" (30). Een uitvoeriger onderzoek van de carotenoiden en zo mogelijk van de overige lipoiden van *Polytoma uvella* leek ons interessant in verband met de typische plaats, die de phytoflagellaten in de taxonomie innemen (vergelijk bijv. (28)). De kennis van de chemische samenstelling (moleculaire morphologie) kan immers naast de microscopische morphologie aanwijzingen verschaffen over phylogenetische verwantschappen (vergelijk bijv. (35)). Ook de carotenoiden zijn in dit opzicht belangrijk gebleken (52). Behalve het feit, dat van de flagellaten nog slechts weinig gegevens bekend zijn wat betreft hun carotenoiden (13), waren verdere overwegingen, die een onderzoek aantrekkelijk maakten:

1e. De chlorophyllvrije saprophytisch levende *Polytoma*-soorten worden beschouwd als afstammelingen (door verlies van de chloroplast) van de chlorophyll bevattende Chlamydo-

*) Een voorlopige mededeling over de inhoud van de hoofdstukken V, VI, VII en IX verscheen in 1954 (1).

monas-soorten (37). Het was met enkele vertegenwoordigers van de Chlamydomonadineae dat Moewus, Kuhn en hun medewerkers hun bekende en tot op heden nog niet bevestigde experimenten verrichtten over de relatieve sexualiteit bij algen^{*)}, waarbij aan de carotenoiden verwante verbindingen het geslacht zouden bepalen (termonen) en mengsels van cis- en transcroetine-dimethylester (carotenoid-derivaten) als copulatiestoffen (gamonen) zouden dienen (31, 32). Door de aard van hun onderzoekingen onderzochten Moewus, Kuhn en hun medewerkers alleen in water oplosbare uitscheidingsproducten. De uitgesproken lipoiden carotenoiden, die in de cel blijven, vielen buiten hun onderzoek en zijn, voor zover ons bekend is, ook door anderen nog niet onderzocht.

2e. Er zou een causaal verband kunnen bestaan tussen het min of meer gelijktijdig verlopen van de eerder vermelde encystering en de grote toename in carotenoid-gehalte.

3e. Aangezien *Polytoma* goed te kweken is, zou hij voor de bestudering van de carotenogenese bij de phytoflagellaten, een tot nu toe onbetreden terrein, kunnen dienen.

Voor een grondige bestudering van deze problemen is het noodzakelijk eerst methoden voor de analyse der aanwezige carotenoiden (en andere lipoiden) te ontwikkelen en een overzicht te verkrijgen van hun aard en de hoeveelheden, waarin ze voorkomen.

Wij stelden ons daarom ten doel:

a) op een geschikt medium grote hoeveelheden van *Polytoma uvella* te kweken en

b) het zojuist omliggende onderzoek uit te voeren. Als leidraad voor de grootte der cultures diende, dat wij van de voornaamste carotenoiden zo mogelijk hoeveelheden van 1 à 2 mg in zuivere toestand wensten te isoleren.

Het onderzoek van de hierbij eveneens geïsoleerde steroïden en hogere vetzuren is beschreven in respectievelijk hoofdstuk VI en hoofdstuk VII.

*) De phytoflagellaten met o.a. de *Chlamydomonas*- en de *Polytoma*-soorten behoren als zelfstandige groep naast, of als deel van de groep der protozoa gerekend, tot het grote rijk der niet-cellulaire organismen (de protisten), waartoe verder behoren de lagere fungi (met o.a. de gisten), de bacteriën en de lagere algen. De grenzen tussen de groepen zijn niet scherp te trekken door de onmogelijkheid, algemeen geaccepteerde, scherpe definities te geven voor de begrippen plant, dier, alg, protozoön enz. (28). Zo komt het, dat men *Polytoma* en *Chlamydomonas* als voorbeeld genoemd kan vinden zowel bij de algen als de protozoa (34, 37).

2. Experimentele gegevens

2. 1. Het kweken van *Polytoma uvella*

Van *Polytoma uvella* "strain I" werden naar aanleiding van literatuur-gegevens en eigen groeiproeven (Hoofdstuk VIII) op twee verschillende media bereid, welke hieronder worden aangeduid als de series 1, 2a en 2b (tabel 1).

Tabel 1

Samenstelling der verschillende media voor het lipoiden-onderzoek c)

Serie-nummer	1	2a en 2b	3 c)	4 c)	5 c)
Componenten	%	%	%	%	
NH ₄ -acetaat	-	-	-	-	0,4
Na-acetaat	0,2	0,2	0,2	0,8	-
Asparagine	~ 0,02b)	~ 0,02b)	-	2,0	~ 0,02b)
Glycine	0,2	0,2	0,2	-	-
Glucose	0,2	0,2	0,2	0,01	-
K ₂ HPO ₄	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Na ₂ CO ₃	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
FeCl ₃	0,0001	-	-	-	0,0001
CaCl ₂	0,001	-	-	-	0,001
Vitamine B ₁	0,00013	-	-	-	-
Gistwater a)	-	10 vol %	10 vol %	10 vol %	-

a) gemaakt met leidingwater,

b) deze concentraties werden verkregen na het (zwaar) enten met een cultuur, die op een asparagine-voedingsbodem was gegroeid.

c) de series 3, 4 en 5 zijn kleine series geweest, die gebruikt werden voor oriënterende proeven. Met serie 2b werden de resultaten van de series 1 en 2a gecontroleerd en bevestigd (§ 4. 4).

De met gedestilleerd water gemaakte voedingsoplossingen werden verdeeld over Erlenmeyer-kolven van 300 tot 1000 ml. De kolven werden voor een derde à de helft gevuld en gesteriliseerd gedurende 20 minuten bij 120°C. De pH werd bij de massacultures voor het steriliseren door toevoegen van verdund zoutzuur of verdunde natronloog ingesteld op 7 - 7.5 en was na het steriliseren 7,5 - 8.

Geënt werd met een op een asparagine-voedingsbodem (0,8% Na-acetaat, 2,0% asparagine, 0,02% K₂HPO₄, 0,01% MgSO₄ · 7H₂O, 0,02% Na₂CO₃) goed groeiende *Polytoma*-cultuur.

De temperatuur van de kweekkamer was 24°C ± 1° en de kweekduur was ~ 3 weken, met dien verstande, dat gewacht werd, totdat ook de laatste *Polytoma*-zygoten bezonken waren en het medium, afgezien van de geëncysteerde zygoten op de bodem, weer helder was. Het daglicht werd niet toegelaten, daar de invloed ervan op het metabolisme van de *Polytoma*'s onbekend is. Van kunstlicht werd tijdens de groei zo weinig mogelijk gebruik gemaakt.

De *Polytoma*'s vormden een dichte oppervlaktelaag ten gevolge van hun sterk aerob karakter, vooral toen de groei zijn grootste dichtheid bereikte. De kolven werden daarom iedere dag even omgeschud. De series werden ieder in één keer bereid en opgewerkt.

Aan het eind van de kweekperiode werd de bovenstaande heldere oplossing grotendeels weggezogen, waarna door centrifugeren (3000 omw./min.) de *Polytoma*'s als een oranje-rode massa verkregen werden. De massa

werd bewaard in een fles van polytheen bij -10°C tot de carotenoiden geëxtraheerd werden. Tabel 2 geeft de opbrengsten van de in tabel 1 vermelde series.

Tabel 2

Serie-nummer	1	2a	2b	3	4	5
Hoev. voedingsopl.	150 l	100 l	100 l	2 l	2,7 l	50 l
Hoev. <i>Polytoma's</i> 1)	100 ml	80 ml	55 ml	2 ml	7 ml	45 ml
Drooggew. <i>Polytoma's</i> 2)	14 g	12 g	7,5 g	-	-	-

1) na centrifugeren

2) bepaald na de extractie der lipoiden.

2. 2. Isolering en scheiding van de carotenoiden, steroïden en vetzuren

2. 2. 1. Isolering van de lipoiden en afscheiding van de vetzuren

Voor de extractie van de *Polytoma's* werden verschillende methoden vergeleken. Het bleek, dat direct suspenderen van de organismen in een oplossing van KOH in methanol een snellere en vollediger extractie gaf dan de meer gebruikelijke methode van extractie van de (eventueel met kwartszand fijngezeven) celmassa met behulp van niet-alkalisch gemaakte oplosmiddelen (aceton, alcohol enz.). Gebruikt werd 1 liter 12% KOH in methanol per 100 ml organismen; de oplossing werd vooraf verzadigd met petroleumaether (kpt 40°-60°C). Vgl. Fromageot en Techang (62), die een oplossing van KOH in aethanol gebruikten voor de zure carotenoiden van *Rhodotorula Sanniei*.

Methanol is een slechter oplosmiddel voor de kleurstoffen dan het meer gebruikte aethanol. Echter aethanol geeft met KOH gekleurde verharingsproducten. Door de methanol met petroleumaether te verzadigen wordt de oplosbaarheid van de carotenoiden zonder hydrophiele groepen ("niet-polair") in dit oplosmiddel toch voldoende.

Het mengsel lieten we ter verzeping en extractie gedurende 40 uur in een stikstofatmosfeer bij kamertemperatuur staan. Na centrifugeren en extraheren met peroxyde-vrije aether tot het extract kleurloos bleef, werd van de grijze celmassa het drooggewicht bepaald. Aan de gecombineerde extracten werd het vijfvoudig volumen uitgekookt aqua dest. toegevoegd. De afgescheiden waterige laag werd verder in een stikstofatmosfeer met aether geëxtraheerd tot kleurloze extracten bereikt waren. De aether-extracten werden na wassen met aqua dest. onder een lage stikstofspanning bij kamertemperatuur drooggedampt (vooraf drogen met Na₂SO₄ werd achterwege gelaten, omdat een deel van de kleurstoffen uit de natte oplossing in aether eraan geadsorbeerd werd). Dit leverde de oranje-rood gekleurde onverzeepbare fractie op. De lichtgele basische waterlaag werd met verdund zoutzuur op p_H 3,5 gebracht en weer met aether tot kleurloos extract geëxtraheerd. De hierbij soms optredende hinderlijke gelvorming verdween, wanneer het extraheren voortgezet werd. De aether-extracten leverden na indampen de rood-bruine onverzeepbare fractie (smp ~40°C) op.

2. 2. 2. Scheiding van de onverzeepbare fractie in carotenoiden en steroïden

Het absorptie-spectrum van deze fractie in petroleumaether vertoon-

de een maximum bij $\sim 450 \text{ m}\mu$ (carotenoiden) en verder een zeer sterke U. V. absorptie met maxima bij 280 en 270 $\text{m}\mu$ (fig. 1a).

Daar bij de vooronderzoekingen gebleken was, dat de in het U. V. absorberende stoffen

- a. niet volledig van de carotenoiden te scheiden waren met de voor de reiniging van de laatsten gebruikelijke adsorbentia en
- b. zowel moeilijkheden opleverden bij de interpretatie der absorptie-spectra van de kleurstoffen, als bij het kristallijn krijgen ervan, stelden we een onderzoek in naar de mogelijkheden om de niet-carotenoiden stoffen te verwijderen.

We vergeleken:

- a. de uitvriesmethode (10)
- b. de extractiemethode (36)
- c. een scheiding met digitonine.

a. De uitvriesmethode

De onverzeepbare fractie werd opgelost bij kamertemperatuur in weinig methanol en gedurende 9 uur op -60°C (vast CO_2 en aceton) gehouden.

Het ontstane witte kristallijne neerslag werd afgecentrifugeerd in een met vast CO_2 afgekoelde centrifuge en daarna opgelost in methanol. Het U. V. absorptie-spectrum van deze oplossing (fig. 2) bleek gelijk te zijn aan dat der bekende provitamines D (3, 26), terwijl bovendien de positieve Liebermann-Burchard-, en Rosenheim-kleurreacties van de stof op een steroid met een aantal geconjugeerde dubbele bindingen duiden (4). Slechts een gering deel van de bij 280 $\text{m}\mu$ absorberende stoffen bleek echter zo uit de onverzeepbare fractie verwijderd te zijn.

In de oplossing in methanol was nl. vóór het uitvriezen de extinctieverhouding $\frac{E_{280 \text{ m}\mu}}{E_{450 \text{ m}\mu}} = 9$ en de gecorrigeerde E-verhouding 5,3 ¹⁾.

Wanneer we de absorptie bij $\sim 280 \text{ m}\mu$ geheel aan de provitamine D-achtige component (en) toeschrijven en die bij $\sim 450 \text{ m}\mu$ aan carotenoiden en als we voor de $E_{\text{cm}}^{\%}$ bij deze λ 's respectievelijk die van ergosterol ($E_{\text{cm}}^{\%} = 268$) en β -caroteen ($E_{\text{cm}}^{\%} = 2500$) gebruikten, correspondeert dus een gecorrigeerde E-verhouding = 5,3 met een concentratie-verhouding $\frac{5,3 \cdot 2500}{268} = \sim 49$.

Na uitvriezen is $\frac{E_{280 \text{ m}\mu}}{E_{450 \text{ m}\mu}} = 4,5$ (gecorrigeerd) en de concentratie-verhouding $\frac{4,5 \cdot 2500}{268} = \sim 42$.

b. De extractiemethode

Aan de onder 2.2.1. genoemde methanolische oplossing werd aqua dest. tot 10% van het totale volume toegevoegd. Door uitschudden met petroleum-aether ($40^\circ\text{--}60^\circ\text{C}$) werden de kleurstoffen verdeeld in de epiphase (petroleum-aether-phase) en de hypophase. De epiphase werd teruggeschud met 90%-methanol. De gecorrigeerde E-verhouding en de concentratie-verhouding in de epiphase waren nu respectievelijk 1,2 en 11.

Deze verhoudingen werden verder gereduceerd tot respectievelijk $\sim 0,5$ en 4,7 na nog 7 x uitschudden met steeds verse hoeveelheden van het dub-

1) De gecorrigeerde E-verhouding werd als volgt berekend: In zuiver ergosterol is de absorptie bij 240 $\text{m}\mu$ en 320 $\text{m}\mu$ practisch gelijk aan 0. Nemen we nu aan, dat de absorptie bij 280 $\text{m}\mu$ alleen aan ergosterol toe te schrijven is en dat tussen 240 $\text{m}\mu$ en 320 $\text{m}\mu$ de "achtergrond"-absorptie lineair verloopt, dan is dus van de absorptie bij 280 $\text{m}\mu$ slechts het gedeelte $\frac{E_{280} - \frac{1}{2}(E_{240} - E_{320})}{E_{280}}$ aan ergosterol toe te schrijven.

bele volume 90% methanol (fig. 1b). De concentratie-verhouding in de epifase was na al deze bewerkingen $\sim 10 \times$ zo gunstig geworden, waarbij echter een aanzienlijk verlies ($\sim 50\%$) aan carotenoiden was opgetreden. Bovendien was nu de hypophase uiteraard relatief veel sterker met in het U. V. absorberende stoffen verontreinigd, dan in het begin.

c. Een nieuwe methode met digitonine

Het bleek, dat een goede en snelle scheiding van de carotenoiden en steroïden in de onverzeepbare fractie mogelijk was met de bekende praecipitatie van steroïden door digitonine (4).

Na oriënterende proeven werd de scheiding aldus uitgevoerd:

Aan de oplossing van het mengsel in absolute aethanol werd een oplossing van digitonine in 90% aethanol toegevoegd in de verhouding van ~ 7 gewichtsdeelen digitonine op 1 gewichtsdeel "provitamine D". Het gewicht aan provitamine D-achtige steroïden werd uit het U. V. absorptie-spectrum berekend met als aanname dat het provitamine D-achtige steroïd identiek met ergosterol was. De gevormde fijne suspensie werd gedurende 15 uur bij -10°C onder stikstof bewaard en vervolgens gecentrifugeerd. Het neerslag werd gewassen met 90% alcohol en aceton, totdat het digitonide nog slechts zwak rose gekleurd was. Het onderzoek van de zo gepraecipiteerde steroïden en andere als digitonide neergeslagen lipoiden wordt afzonderlijk beschreven (hoofdstuk VI).

Aan de heldere alcoholische oplossing, waaraan ook de wasvloeistoffen toegevoegd waren, werd ongeveer een gelijk volume aether toegevoegd en daarna voorzichtig een $2 \times$ grotere hoeveelheid aqua dest. De carotenoiden begaven zich kwantitatief in de aetherlaag. Wanneer het water eerst werd toegevoegd en daarna pas de aether, ging de extractie veel moeilijker. Na $2 \times$ wassen van de aetherlaag met aqua dest. ter verwijdering van de overmaat digitonine, de aceton en de alcohol werd in een stikstofatmosfeer van lage spanning drooggedampt.

Wat de volledigheid van en de verliezen bij deze methode betreffen, delen wij het volgende mede. Bij voorproeven met een mengsel van $\sim 0,3$ mg β -caroteen en ~ 30 mg ergosterol (of cholesterol) bleek, dat bij uitvoering van de scheiding bij kamertemperatuur, bij kunstlicht en onder stikstof het ergosterol practisch kwantitatief als digitonide kon worden gepraecipiteerd, terwijl steeds meer dan 75% van het β -caroteen kon worden teruggewonnen. Uit het digitonide werd steeds meer dan 80% van het oorspronkelijke ergosterol teruggewonnen (Hoofdstuk VI). Wanneer daglicht werd toegelaten, of wanneer het digitonide werd gevormd bij 50° - 70°C (6), werden veel minder gunstige resultaten verkregen, vooral wat betreft de hoeveelheid teruggewonnen β -caroteen.

Deze scheidingsmethode met digitonine werd toegepast op de onverzeepbare fracties van de series 1 en 2a. In beide gevallen werd het verkregen oranje-rode neerslag verdeeld over petroleumaether (kpt. 40° - 60°C) en 90% methanol; epi/hypophase scheiding.

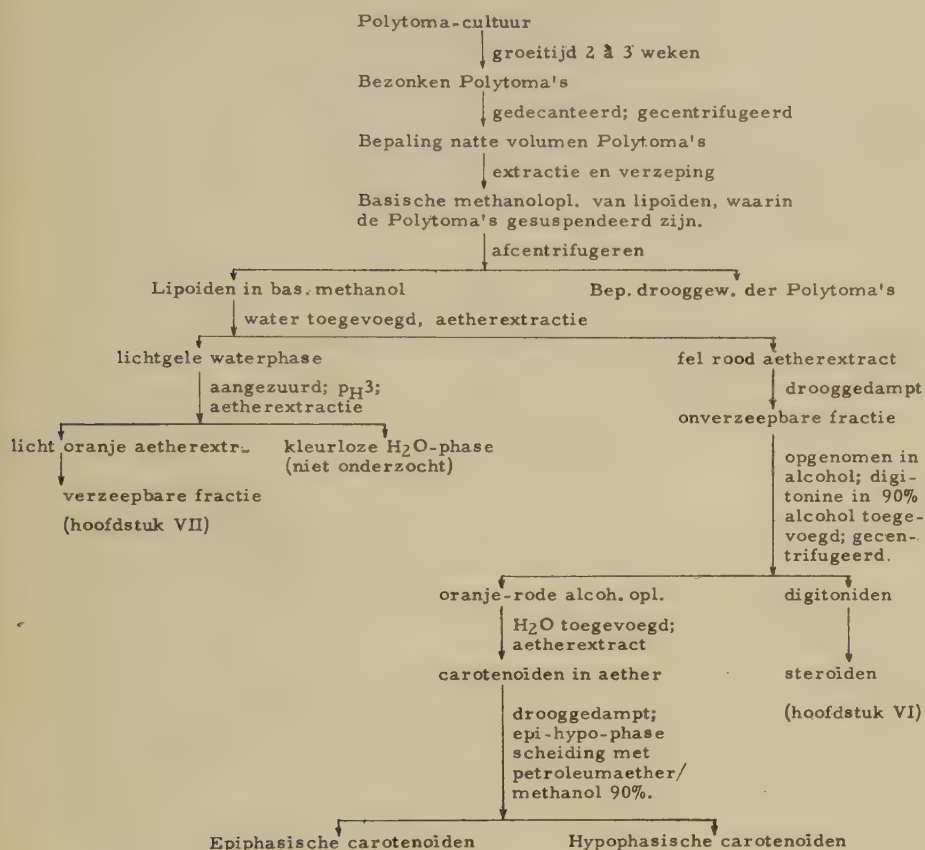
Uit de absorptie-spectra (fig. 3 en 4) werd berekend, dat de verhouding $\frac{\text{concentratie "provitamine D"}}{\text{concentratie carotenoiden}}$ in de epifases van de series 1 en 2a respectievelijk 2,1 en 0,65 bedroeg.

Ook met opnieuw toevoegen van digitonine was de kleine rest van provitamine D-achtige lipoiden niet te praecipiteren. Het bleek echter, dat de tot dusver bereikte graad van zuiverheid voldoende was voor verdere isolering van de epifasische carotenoiden.

Uit de spectra van de hypophasen bleek, dat hier na de digitonine-behandeling, behalve de carotenoiden, nog stoffen met een sterke U. V. absorptie, ongelijk aan die der provitamines D, aanwezig waren.

In tabel 3 is een samenvattend schema van de isolering weergegeven.

Tabel 3

Schema voor de isolering van de lipoiden uit *Polytoma uvella*

2. 3. Voor-onderzoekingen bij de scheiding van het carotenoiden-mengsel

Teneinde een indruk te krijgen van de mate van adsorptie aan de verschillende adsorbentia en de gecompliceerdheid van het carotenoiden-mengsel en om het gevaar te vermijden, dat aan een te sterk adsorbens een relatief grote hoeveelheid kleurstof door irreversibele binding verloren zou gaan, werden twee chromatografische micro-methoden gevolgd:

- de "platen-methode" van Williams (7) en
- de circulaire papierchromatografie.

a. De platen-methode

Het hierbij gebruikte apparaatje bestond uit twee horizontaal op elkaar liggende planparallelle glazen platen ($\sim 20 \times 20$ cm), waarvan de bovenste in het midden van een ingeboord gat voorzien was. Als verbetering t. o. v. de door Williams (7) beschreven methodiek werd hierin een ingeslepen open glazen buisje (inwendige $\varnothing$ 3 mm, uitwendige $\varnothing$ 4,5 mm, hoogte 40 mm) geplaatst. Tussen de platen werd een hoopje adsorbens door gelijkmatig draaien van de bovenste plaat uitgewreven tot een homogene cirkelvormige laag van $\sim 1\frac{1}{2}$ mm dikte. Achtereenvolgens werden enkele druppels van het te onderzoeken carotenoidenmengsel en de ontwikkelvloeistof in het buisje gebracht.

Tabel 4

De resultaten van de voorproeven met de onverzeepbare fractie van *Polytoma uvella* in de platen-methode

Adsorbens	Ontwikkelvloeistof	Uiterlijk na ontwikkelen
Al_2O_3 ; activiteit 1 a)	pae. + 1-2% methanol d)	rode kern $R_F \sim 0$ gele band $R_F \sim 50$
Al_2O_3 , 20 min. gedesactiveerd b)	pae. + 4% methanol	rode kern $R_F \sim 0$ gele band $R_F \sim 75$ donkergele band $R_F \sim 25$
Al_2O_3 , 30-40 min. gedesactiveerd b) activiteit 4 a)	pae. + 4% methanol	idem c)
MgO	pae. + 4% methanol	rode band $R_F \sim 10$ gele band $R_F \sim 75$
MgCO ₃	pae. + 25-50% aether of pae. + 4% methanol	rode band $R_F \sim 20$ 2 rode banden $R_F \sim 50$ gele band $R_F \sim 90$
Ca ₃ (PO ₄) ₂	pae. + 4% methanol of pae. + 25% aether	rode band $R_F \sim 50$ gele band $R_F \sim 90$
CaCO ₃	pae. + 4% methanol	rode band $R_F \sim 75$ gele band $R_F \sim 90-100$
zetmeel	pae. + 2% methanol	oranje band $R_F \sim 100$

a) activiteit bepaald volgens Brockmann en Schodder (9).

b) met methanol gedesactiveerd volgens Goodwin (10).

c) rode kern, die de meeste kleurstof bevat en niet te ontwikkelen is met aether, methanol, butanol, H_2O , aethanol + 2% KOH, aethanol + 5% azijnzuur of benzeen.

d) pae. + 1% methanol = petroleumather (40-60°C), waaraan 1% methanol is toegevoegd.

Door 4 opstellingen naast elkaar te gebruiken, konden snel (~ 10 min. per proef) en met weinig stof (< 1 μg carotenoidenmengsel per proef) verscheidene combinaties van adsorbentia uit de door Strain (8) genoemde reeks, alsmede elutie-middelen vergeleken worden.

Onderzocht werden: 1e. de onverzeepbare fractie (§ 2. 2. 1)

2e. de epiphasische kleurstoffen (§ 2. 2. 2. c)

3e. de hypophasische kleurstoffen (§ 2. 2. 2. c)

De resultaten van de voorproeven met de onverzeepbare fractie van

Polytoma uvella zijn in tabel 4 samengevat. Ongeveer dezelfde resultaten werden verkregen met de epiphasische kleurstoffen. Met de hypophase trad één rode band op.

Uit tabel 4 trokken we de volgende conclusies:

1. $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en MgCO_3 geven een goede scheiding van de rode, meest polaire, en de gele componenten, waartussen een groot verschil in adsorptie bestaat.
2. De rode pigmenten zijn onderling goed te scheiden op MgCO_3 .
3. Aan (gedesactiveerd) Al_2O_3 wordt een deel der rode componenten irreversibel geadsorbeerd.
4. Petroleumaether met toenemende hoeveelheden aether (eventueel methanol) is een goed eluerings-middel.

Bij vergelijking van de resultaten verkregen met de platen-methode en die van de kolomchromatografie (kolom $\varnothing$ 1 cm) bleken de R_f -waarden in het laatste geval iets groter te zijn. Waarschijnlijk moet dit toegeschreven worden aan het feit, dat bij de platen-methode de capillaire effecten een relatief grotere rol spelen.

b. De circulaire papierchromatografie

Deze van Rutter (11) afkomstige variatie op de bekende papier-chromatografie, zoals die oorspronkelijk door Consden, Gordon en Martin (12) geïntroduceerd werd, onderscheidt zich daardoor, dat de verticale papierstrook vervangen is door een horizontaal blad filtreerpapier, waarop het te onderzoeken mengsel in het midden aangebracht wordt, evenals het eluerings-middel.

In plaats van een alleen aan de rand ondersteunde schijf, gebruikten wij de onder 2.3.a beschreven platen (de geperforeerde onder) waartussen de schijf filtreerpapier (Whatman no. 1) kwam te liggen, terwijl een radiaal uit de schijf geknipte 3 mm brede strook, die bijna tot het midden liep en daar rechthoekig omgebogen was, door het boorgat van de onderste plaat stak. De strook dook in een petri-schaal, die door de platen afgesloten werd.

Enkele druppels van de onverzeepbare fractie werd in aether-oplossing in het midden opgebracht in een stikstofstroom. De Petri-schaal werd daarna gevuld met het eluerings-middel, dat door de strook opgezogen werd.

De volgende waarnemingen werden gedaan:

1. Van de verschillende onderzochte oplosmiddelen gaf alleen methanol een goede scheiding in een rode en een gele ring waarvan de R_f respectievelijk 71 en 63 was. De volgorde van de rode en de gele fracties was hier dus juist het omgekeerde van die bij de onder a. genoemde proeven.
2. Bij een reeks proeven, waarbij een niet verzeept aceton-, en een niet verzeept petroleumaether-extract van de Polytoma's onderzocht werden, bleek de rode fractie, die dus nu waarschijnlijk ook xanthophyllesters bevatte, in beide gevallen te splitsen te zijn in verscheidene componenten. Van dit feit werd verder door ons geen gebruik gemaakt.
3. Het weglaten van de platen maakte dat de scheiding veel minder goed werd, terwijl de afzonderlijke ringen breder en vager werden.
4. Voor een scherpe scheiding van het mengsel was een volkomen rechthoekig ombuigen van de radiale strook vlak voor het midden noodzakelijk.

2. 4. Scheiding en karakterisering van de carotenoiden

2. 4. 1. De epiphasische carotenoiden (E. P.)

De epifasen van de series 1 en 2a werden elk gechromatografeerd op een kolom van $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ met petroleumaether als oplos- en elutiemiddel. In beide gevallen trad een splitsing op in een gele, weinig geadsorbeerde fractie (E. P. G.), die met petroleumaether geëluëerd kon worden en een rode fractie (E. P. R.), bestaande uit verscheidene banden met weinig verschillende R_F waarden.

Deze rode fractie werd in zijn geheel met petroleumaether + 25% aether geëluëerd.

Zowel hier, als bij de nog te bespreken experimenten werd steeds van de kleurloze tussenfracties het U. V. absorptiespectrum bepaald. De in sommige gevallen waargenomen toenemende absorptie van 280 m μ tot 220 m μ , zonder duidelijk maximum en zonder dat een noemenswaardige hoeveelheid droge stof aanwezig was, bleek volgens blanco proeven toe te schrijven te zijn aan stoffen uit de betreffende adsorbentia.

In de figuren 5 en 6 zijn de absorptie-spectra van E.P.G. en E. P. R. voor de series 1 en 2a weergegeven. Daar de spectra van de overeenkomstige fracties in de beide series dezelfde absorptie-maxima hadden en ook de concentraties ervan onge-

Tabel 5.

Hoeveelheden van de carotenoiden in de series 1 en 2a 1)

Geïsoleerd	Totaal		per ml Polytoma's		per g drooggewicht 3)	
	1	2a	1	2a	1	2a
Onverzeepbare fractie 2)	-	~ 5000	-	61	-	420
E. P. G. 4)	1000	800	10	10	71	65
E. P. R.	3500	3600	35	45	250	300
H. P.	350	500	3,5	6,1	25	41

1) Alle hoeveelheden zijn in μg opgegeven. Voor de berekening van de hoeveelheden werd overal $E_{1\%}^{1\text{cm}}(450\text{ m}\mu) = E_{1\%}^{1\text{cm}}(450\text{ m}\mu)$ voor β -caroteen = 2500 aangenomen.

2) Bij de contrôle-serie 2b, die onderzocht werd na de series 1 en 2a, zijn de getallen van de onverzeepbare fractie in de horizontale rij respectievelijk 3000, 55 en 400.

3) Het drooggewicht van de series 1 en 2a werd na de extractie van de lipoiden bepaald op respectievelijk 14 en 12 g;

4) E. P. G. = gele epiphasische fractie

E. P. R. = rode epiphasische fractie

H. P. = hipophasische fractie.

veer gelijkwaardig waren (de nauwkeurigheid van de isolering en de bepalingen in aanmerking nemende) combineerden we voor het verdere onderzoek deze fracties van de beide series. Ook de hypophases werden gecombineerd.

In tabel 5 zijn enkele quantitatieve gegevens samengevat.

2. 4. 2. De gele fractie van de epiphasische carotenoiden (E. P. G.)

De E. P. G. kon door chromatografie over Ca(OH)_2 en in iets mindere mate over Al_2O_3 (activiteit 1 (9)) met petroleum-aether als oplosmiddel gescheiden worden in:

- a. een gele component (A) en
- b. een sterker hechtende oranje component (B).

De breedteverhouding van de A en de B zone was 5:1. De absolute breedte hangt natuurlijk af van de kleurstofconcentraties, de kolomafmetingen, de ontwikkelsnelheid etc.

A werd geëlueerd met petroleumaether en B met petroleumaether + 10% aether. Beide kleurstoffen werden nog enige malen gechromatografeerd op Ca(OH)_2 voor een verdere zuivering.

2. 4. 3. Kleurstof A

Voor de absorptie-spectra in petroleumaether en in CS_2 vergelijkte men fig. 7. A is epiphasisch t. o. v. zowel neutrale als basische 95% methanol. (Petroleumaether (40° - 60°) is steeds de epiphase). Het wordt uit petroleumaether zeer weinig geadsorbeerd aan CaCO_3 en $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en goed (met gele kleur) aan Al_2O_3 , MgCO_3 en Ca(OH)_2 . De oplosbaarheid is zeer slecht in methanol en aethanol, vrij slecht in petroleumaether (citroengele oplossing), goed in aether en zeer goed in CS_2 (rose-rode kleur).

De spectra, waarbij we vooral wijzen op de sterke absorptie bij $336 \text{ m}\mu$ ("cis-top") (15, 16) en de fysisch-chemische eigenschappen maken het waarschijnlijk, dat kleurstof A een cis-isomeer is van een kleurstof B, welke zoals verderop blijkt, identiek aan β -caroteen is.

Daar A minder dan B geadsorbeerd wordt en dus op de kolom onder B komt, komen van de cis-isomeren van β -caroteen neo- β -caroteen A, B, C, D en E in aanmerking (13, 14).

Waar de absorptie bij $336 \text{ m}\mu$ relatief heel sterk is, zijn B en E het meest waarschijnlijk. (vgl. tabel 6). In elk geval kunnen we reeds constateren, dat A één van de mono- of dicis-vormen is met een centraal gelegen cis-dubbele binding (15, 16).

Nemen we verder in aanmerking:

1. dat de vorm van de absorptie-curven van neo- β -caroteen B in iso-octaan (17) en die van kleurstof A in petroleumaether identiek zijn,

2. dat de quotiënten $\frac{\text{Extinctie } 336 \text{ m}\mu}{\text{Extinctie hoogste max. } (\sim 440 \text{ m}\mu)}$ praktisch gelijk zijn, nl. respectievelijk 0,37 (17) en 0,41,
3. en dat de absorptiemaxima iets naar hogere λ verschuiven naarmate deze opgenomen worden in een hoger kokende (verzadigde) koolwaterstof (regel van Kundt: een absorptiemaximum verschuift naar langere golflengte, als de brekingsindex van het oplosmiddel hoger wordt), dan komen we tot de conclusie, dat kleurstof A zeer waarschijnlijk identiek is met neo- β -caroteen B.

Waar slechts 50 μg van de gezuiverde kleurstof aanwezig was (berekend uit het spectrum) zagen we van omkristalliseren af.

Tabel 6

Vergelijking van de absorptiemaxima van kleurstof A en van neo- β -caroteen B en E

Kleurstof	Oplosmiddel	Absorptiemaxima (m μ)
neo- β -caroteen E	pae. 70°-80°C	477,5 ; 445 (16)
neo- β -caroteen B	pae. 70°-80°C	475,5 ; 443,5 (16)
neo- β -caroteen B	iso-octaan	470 ; 443 (17)
Kleurstof A	pae. 40°-60°C	466-468 ; 441

2. 4. 4. Kleurstof B

Het absorptie-spectrum van B in petroleumaether en CS₂ is weergegeven in fig. 8. B is zuiver epifasisch in petroleumaether t.o.v. neutrale en basische 95% methanol. Het chromatografisch gedrag en de oplosbaarheden van B zijn vrijwel gelijk aan die van A, alleen wordt B steeds iets sterker geadsorbeerd.

Daar het absorptie-spectrum en de overige eigenschappen identiteit met β -caroteen deden vermoeden, vergeleken we B met 2 verschillende monsters zuiver β -caroteen (tabel 7).

Toen kleurstof B, kleurstof B + β -caroteen en β -caroteen chromatografisch vergeleken werden volgens de "drie-buizenmethode" (18) met Ca(OH)₂ als adsorbens, werd geen verschil in R_F waarden gevonden.

Na de chromatografische zuivering beschikten we over 1,5 mg B. Na éénmaal omkristalliseren uit benzeen + methanol was het smeltpuntstraject 147-170°C (ongecorrigeerd) en na nog 2 x omkristalliseren uit petroleumaether werd het smeltpunt 176-179°C (gecorrigeerd). Van nogmaals omkristalliseren werd afgezien in verband met de zeer geringe ter beschikking staande hoeveelheid. In de literatuur wordt voor het smeltpunt van β -caroteen 181-183°C opgegeven (14).

Tabel 7

Vergelijking van de spectra van kleurstof B en β -caroteen

Kleurstoffen	Absorptiemaxima in	
	pae. 40°-60°C	CS ₂
β -caroteen 1)	m μ (426) ³ ; 450; 476	m μ - -
β -caroteen 2)	- ; 449; 475	482; 511
kleurstof B	(423) ; 448; 475	482; 511

1) zuiver monster, gekregen van Prof. Dr L. Zechmeister

2) monster uit de laboratorium-verzameling, gezuiverd door chromatografie over Ca(OH)₂3) (426) betekent buigpunt bij 426 m μ

Bij microscopisch onderzoek bleek de 3 x omgekristalliseerde stof B uit donkerrode ruitjes te bestaan, terwijl geen kleurloze verontreinigingen aanwezig waren. Bij omkristalliseren (in stikstofatmosfeer en bij kunstlicht) ontstonden (cis-)isomeren, die in de moederloog achterbleven (zie tabel 8).

Tabel 8

Vergelijking van de absorptie-spectra van A, B en de kleurstof (fen) in de verzamelde moederlogen van B.

Kleurstof	Absorptiemaxima boven 400 m μ		Cis-top in pae.	E 336 m μ gedeeld door E hoogste max. in pae.
	in pae. 40°-60°C	in CS ₂		
B (= β -caroteen)	m μ (423); 448; 475	m μ 482; 511	m μ geen	m μ 0,06
Kleurstof (fen) i. d. moederlogen van B	(423); 444; 472	478;(504)	336	0,21
A (= neo- β -caroteen B)	(420); 441; 466	474;(500)	336	0,40

2. 4. 5. De rode fractie van de epiphasische carotenoiden (E. P. R.)

Wij vermeldden reeds, dat de E. P. R. -fractie door chromatografie op een MgCO₃ kolom verder te ontleden was in verschillende componenten. Het bleek, dat enige componenten vanuit petroleumaether zeer sterk aan het door ons gebruikte MgCO₃ (vgl. § 3. 2) adsorbeerden. Elutie bleek onmogelijk met petroleumaether, droge aether, aceton, CS₂, chloroform, dichlooraethaan, benzeen, methanol, aethanol en pyridine. Practisch quantitative extractie werd echter verkregen met

natte aether of met (natte) aether + 5% azijnzuur. Ook het ontwikkelen ging veel beter met natte aether dan met droge aether. Door dus als oplosmiddel petroleumaether en als eluëringsmiddel petroleumaether + toenemend % natte aether te kiezen en door de chromatografie enige malen te herhalen, konden 9 fracties verkregen worden. Deze nog niet geheel homogene fracties werden verder gezuiverd door ieder afzonderlijk weer op het zelfde adsorbens te chromatograferen met het zelfde oplosmiddel en het zelfde eluëringsmiddel, waarbij van elke fractie de voorloop(respectievelijk de naloop) bij die component gevoegd werd, die in de rij van afnemende adsorbtie-affiniteiten volgt op (respectievelijk voorafgaat aan) de hoofdc component van die fracties.

Wij kregen zo 9 chromatografisch verschillende zuivere componenten. Bij combineren van 2 opeenvolgende componenten bleken deze steeds weer te scheiden te zijn op de kolom, zodanig, dat bij elutie een kleurloze tussenfractie werd opgevangen. Voor gegevens van deze componenten zie tabel 9.

Tabel 9

Gegevens over de 9 carotenoiden geïsoleerd uit de E.P.R.-fractie

Kleur-stoff)	Geïsoleerde aantal µg a)	Epi-Hypoph. gedrag			kleur in pae c)	kleur aan MgCO ₃	van MgCO ₃ te eluëren met d)	Abs. maxima (mµ) in e)	
		95%	90%	85% b)				pae.	Cs ₂
C	53	h-e	e	e	hel-geel	geel	pae.	401, (± 380), (330)	431
D	575	e	e	e	geel-oranje	oranje	pae. + 2%	454	490
E	87	e	e	e	geel-oranje	rose-oranje	pae. + 5%	(425), 448, 474	483, (505)
F	2	...	...	...	violet	blauw	pae. + 10%	454, 476	
G ¹	6	e	e	e	oranje	rose-oranje	pae. + 10%	447	480
G	12	h	e	e	geel-oranje	rose-oranje	pae. + 10 à 15%	459	496
H	50	e	e	e	geel	geel	pae. + 10 à 15%	455	489
I	68	e	e	...	geel-oranje	oranje	pae. + 10 à 15%	460-470	503
J	1700	e	e	e	rood	bordeaux rood	pae. + 20%	460-464	

- berekend met $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (450 mµ) van β-caroteen = 2500.
- epi-hypoph. gedrag met 95% = verdeling tussen gelijke volumina pae. 40°-60°C en 95% methanol; h = uitsluitend hypoph.; h = grotendeels hypoph.; h-e = ~ 50% epi- en ~ 50% hypoph.; e = grotendeels epiph.; e = uitsluitend epiph.
- bij ongeveer gelijke concentratie
- pae. + 2% = petroleumaether (40°-60°C) + 2% natte aether enz.
- (425) = buigpunt bij 425 mµ enz.
- De kleurstoffen zijn gerangschikt in volgorde van toenemende adsorptie-affiniteit voor MgCO₃.

Uit 6,0 mg E.P.R. werden 9 zuivere carotenoiden verkregen met een totaal (berekend) gewicht van $\sim 2,6$ mg.

Het verlies is te wijten aan het enige malen niet verder gebruiken van zwak gekleurde tussenfracties en het herhaaldelijk ($\sim 30\times$) chromatograferen, waarbij vaak een klein gedeelte van de kleurstoffen irreversibel geadsorbeerd boven in de kolom achterbleef (ontledingsproducten?).

Van de quantitatief voornaamste E. P. R. carotenoiden D en J volgt nu een nadere karakterisering.

2. 4. 6. Kleurstof D (vergelijk tabel 9)

De oplosbaarheid van D bij kamertemperatuur is vrij slecht in methanol, goed in aether, benzeen en CS_2 en zeer goed in CHCl_3 . De kleurstof is epifasisch ten opzichte van neutrale, basische en zure methanol (95, 90 en 85%) en heeft dus geen zure eigenschappen. D adsorbeert in petroleumaether oplosing niet aan CaCO_3 , maar wel aan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, MgCO_3 en MgO .

Het absorptie-spectrum werd bepaald in petroleumaether ($40^\circ\text{--}60^\circ$), CS_2 en absolute aethanol (fig. 9), terwijl verder nog de absorptiemaxima bepaald werden in petroleumaether ($80^\circ\text{--}100^\circ\text{C}$), benzeen en CHCl_3 (tabel 17 in § 4. 3).

D geeft in petroleumaether met geconcentreerd H_2SO_4 een blauw-groene kleur en met geconcentreerd HNO_3 practisch geen kleur. Met geconcentreerd H_3PO_4 en geconcentreerd HCl treedt geen kleuring op.

Pogingen tot omkristalliseren uit mengsels van benzeen en methanol en van chloroform en methanol moesten gestaakt worden in verband met de kleine beschikbare hoeveelheid. Microscopisch onderzoek van het chromatografisch zuivere carotenoid toonde aan, dat practisch geen kleurloze verontreinigingen aanwezig waren.

2. 4. 7. Kleurstof J

J werd omgekristalliseerd uit benzeen en methanol en de kristallen werden nagewassen met methanol. Het smeltpunt was toen $173^\circ\text{--}176^\circ\text{C}$ (gecorrigeerd). Verder omkristalliseren was in verband met de geringe hoeveelheid niet mogelijk.

Microscopisch werden donkerrode, glinsterende kristalletjes waargenomen, waaraan geen specifieke kristalvorm was te onderkennen. Het microscopisch praeparaat was vrij van ongekleurde verontreinigingen.

Bij kamertemperatuur is J slecht oplosbaar in petroleum-aether en methanol en goed (met dieprode kleur) in aether, benzeen en CS_2 . In polaire oplosmiddelen (methanol, aceton, enz.) treedt een kleurverdieping op ten opzichte van apolaire oplosmiddelen.

Tabel 10

De verdeling van J tussen petroleumaether en verschillende neutrale, basische en zure methanol- H_2O mengsels ¹⁾).

Hypophase	"Neutraal"	+ 5% KOH	+ 5% azijnzuur	aangezuurde, oorspronkelijk basische hypophase ²⁾
95% methanol	e	h	e	e
90% methanol	e- <u>e</u>	h	e- <u>e</u>	e- <u>e</u>
85% methanol	<u>e</u>	h-e	<u>e</u>	<u>e</u>
80% methanol	<u>e</u>	e	<u>e</u>	<u>e</u>
75% methanol	<u>e</u>	e	<u>e</u>	<u>e</u>
70% methanol	<u>e</u>	<u>e</u>	<u>e</u>	<u>e</u>

1) Voor de verklaring van de afkortingen, zie tabel 9 (§ 2. 4. 5)

2) Dit illustreert het reversibele gedrag van J.

Uit tabel 10 blijkt het zwak zure gedrag van J.

Bij de epi-hypophase-scheiding (petroleumaether 40° - 60°C /90% methanol) van het oorspronkelijke carotenoidenmengsel uit *Polytoma uvella* (§ 2. 2. 2. c) werd van de (epiphasische) kleurstof J $50\text{ }\mu\text{g}$ in de hypophase teruggevonden en $1700\text{ }\mu\text{g}$ in de epiphase, zodat kleurstof J voor $\sim 97\%$ epiphasisch is ten opzichte van 90% methanol. Dit klopt met tabel 10, waar we weer zien, dat J ten opzichte van 90% methanol niet geheel epiphasisch is. De oplossing van J in 50-75% methanol is met 10% KOH geel en met 10% azijnzuur rose-rood gekleurd. Dit correspondeert met het feit, dat het(enkele) absorptiemaximum in basisch milieu bij kortere golflengte ligt dan dat in zwak zuur. Het verschil bedraagt $\sim 10\text{ m}\mu$ in 90% methanol en wordt groter, als het watergehalte toeneemt. Bovendien verschuiven beide maxima dan naar langere golflengte. Bij deze experimenten trad bij toevoeging van meer water aan het oplosmiddel een lichte troebeling op, waardoor de resultaten beïnvloed kunnen zijn.

Uit petroleumaether wordt J zwak geadsorbeerd aan CaCO_3 , matig aan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, sterk aan MgCO_3 , zeer sterk aan MgO en $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en irreversibel aan Al_2O_3 . De irreversibele adsorptie aan Al_2O_3 wijst, in verband met de basische reactie van het Al_2O_3 voor chromatografische doeleinden, eveneens op het zure karakter van J. Op al de genoemde adsorbentia gedroeg J zich als een chromatografisch zuivere stof.

In fig. 10 zijn de absorptie-spectra van J in petroleumaether (40° - 60°C), benzeen en CS_2 weergegeven. In hexaan werd alleen het absorptiemaximum bepaald (tabel 19).

In navolging van Zechmeister (58) pasten wij de door jodium gekatalyseerde isomerisatie-proef toe op kleurstof J.

Vergelijk tabel 11.

Tabel 11

Isomerisatie-omstandigheden met jodium bij kleurstof J

Omstandigheden ¹⁾	Absorptiemax.	Extinctie (max.)
geen toevoegingen	462-464 mμ	0,450
1 uur in daglicht + 2%	460 mμ	0,430
1 uur in daglicht + 3%	460 mμ	0,420
$\frac{1}{2}$ uur in de zon + 7%	460 mμ	0,380

1) 2% = 2% jodium, uitgedrukt in gewichts% van de kleurstof J, waarvan 50 γ in 2 ml. petroleumaether gebruikt werd.

Onder de in tabel 11 genoemde omstandigheden bleef de extinctie tussen 300 en 400 mμ ongeveer gelijk; er trad geen "cis-top" op. Een gelijkwaardig behandelde oplossing van β-caroteen (50 μg in 2 ml. petroleumaether) vertoonde na 1 uur staan met 2% jodium in het daglicht wel een duidelijke "cis-top", nl. bij 338 mμ, overeenkomstig de literatuur (11).

Ten opzichte van zuurstof is J stabielier dan β-caroteen. We concludeerden dit uit het feit, dat het absorptie-spectrum van J in petroleumaether (80°-100°C), gemeten tussen 310 mμ en 550 mμ, praktisch niet veranderde, als gedurende 5 uur bij 50°C lucht doorgeleid werd.

Bij β-caroteen waren na een gelijke behandeling de absorptiemaxima iets naar langere golflengte verschoven, ~ 20% in extinctie gedaald en minder scherp geworden, terwijl bovendien een duidelijke "cis-top" ontstaan was bij 338 mμ + 2 mμ.

J geeft in CHCl₃-oplossing met geconcentreerd H₂SO₄ een blauw-groene, met geconcentreerd H₃PO₄ na langere tijd een blauwe en met geconcentreerd NH₄O₃ een zwak groene kleur. In petroleumaether zijn deze kleureffecten resp. blauw, groen en (zeer snel verblekend) blauw-groen.

In beide oplosmiddelen is met geconcentreerd HCl na 16 uur staan geen kleur te constateren.

In tegenstelling met astaxanthine (tabel 17) geeft kleurstof J met K-butoxide onder uitsluiting van O₂ géén diep blauw K-zout. (Het K-zout van astaxanthine wordt bij aanwezigheid van O₂ dadelijk omgezet in het rode astacine (14)).

In tegenstelling met astacine (tabel 17) is J met petroleum-aether te extraheren uit methanol/water (1 v : 1 v), waaraan 10% KOH toegevoegd is (41). Kleurstof J is niet uit aether te extraheren met 20% KOH in water. Astacine hoopt zich onder deze omstandigheden als rood K-zout in de vloeistof-vloeistof grenslaag op (41).

(Astaxanthine en astacine werden voor deze vergelijkingsproeven uit de schaal en de eieren van de kreeft (*Homarus vulgaris*) geïsoleerd volgens een voorschrift van Goodwin en Srisukh (14). De volgorde van afnemende adsorptie aan MgCO_3 (ontwikkelvloeistof: pae. + 1% aethanol) is astacine > J > astaxanthine, zoals bleek uit mengchromatogrammen *).

Voor een discussie over de mogelijke structuur van kleurstof J zie § 4. 3. 2.

2. 4. 8. De overige E. P. R. kleurstoffen

De componenten C en F vertoonden een sterke U. V. absorptie. Zij werden niet verder onderzocht. Misschien zijn het ontledings- of isomeratieproducten van de carotenoiden uit *Polytoma uvella*. De absorptie-spectra van kleurstof E in petroleumaether en in CS_2 zijn weergegeven in fig. 11.

Evenals de hoofdcomponenten D en J van de E. P. R. fractie bezitten de in geringe hoeveelheden voorkomende kleurstoffen G¹, G, H en I een min of meer symmetrisch absorptie-spectrum met één maximum (zie fig. 12 en 13).

2. 4. 9. De hypophasische kleurstoffen (H. P.) (§ 2. 2. 2. c)

De H. P. kleurstoffen werden, opgelost in petroleumaether, eveneens gebracht op een MgCO_3 -kolom, waarna het chromatogram ontwikkeld werd met mengsels van petroleumaether en toenemende hoeveelheden natte aether.

Terwijl de E. P. kleurstoffen steeds achter elkaar uit de intacte kolom geëluëerd werden, pasten wij hier een iets andere techniek toe: de kolommen werden na het ontwikkelen uit de chromatographie-buizen geduwd, waarna de fracties door uitsnijden gescheiden en in erlenmeyers geëluëerd werden.

Door de chromatografie van alle fracties weer enige malen te herhalen, zoals dat reeds beschreven is bij de E. P. R. kleurstoffen, werden uiteindelijk 4 chromatografisch zuivere hypophasische componenten verkregen naast kleinere hoeveelheden van de hoofdcomponenten uit de E. P. R. (totaal 100 μg), die uiteraard ook in de H. P. voorkomen (tabel 12).

Ook hier werden herhaaldelijk zwak gekleurde tussenfracties weggeworpen en bleef soms een klein deel van de carotenoiden boven in de kolom irreversibel geadsorbeerd achter, zodat de uiteindelijk verkregen absolute hoeveelheden niet geheel als maatstaf kunnen gelden voor de in vivo voorkomende hoeveelheden.

*) De proeven met astaxanthine en astacine werden verricht door de heer G. W. Boot, die wij hiervoor gaarne onze dank betuigen.

Tabel 12 3)

Gegevens van de 4 zuivere H. P. -kleurstoffen:

kleur- stof 1)	geiso- leerde hoeveelh. in $\mu\text{g.}$	epi- hypo- phasisch gedrag			kleur in pae.	kleur aan MgCO_3	van MgCO_3 te eluëren met	Absorptiemaxima ($m\mu$) in	
		95%	90%	85%				pae.	CS_2
HP1	5	h	h	h	rood- violet	blauw	pae. + 5%	2)	2)
HP2	12	h	h	h	geel- oranje	geel	pae. + 8%	(375) 398 (420)	430-460
HP3	6	h	h	h	rood- violet	blauw	pae. + 15%	2)	2)
HP4	153	<u>h-h</u>	h	h-e	rood- oranje	rood- oranje	pae. + 20%	458	491

1) De kleurstoffen zijn gerangschikt in volgorde van toenemen-
de adsorptie-affiniteit.

2) zie fig. 15

3) zie voor de gebruikte afkortingen tabel 9 van § 2. 4. 5.

2. 4. 10. Kleurstof H. P. 4

H. P. 4, het quantitatief voornaamste H. P. -carotenoid, is slecht oplosbaar in petroleumather, goed in aether en CS_2 en zeer goed in methanol. De kleur van de oplossingen in aether, CS_2 en methanol is donkerrood.

Van omkristalliseren werd afgezien in verband met de geringe hoeveelheid. In droge toestand is H. P. 4 donkerrood. Zijn zwak zure eigenschappen blijken uit tabel 13. We hebben klaarblijkelijk te maken met een stof, die als negatief ion hypophasische en als neutraal molecuul epiphasisch is.

Tabel 13. 1)

Het epi-hypophasische gedrag van H. P. 4 onder verschillende omstandigheden

Hypophase	"Neutraal"	+ 5% KOH	+ 5% azijnzuur	aangezuurde basische hypophase 2)
95% methanol	<u>h-h</u>	h	<u>e</u>	e
90% methanol	h	<u>h-h</u>	<u>e</u>	e
85% methanol	h-e	h	<u>e</u>	e
80% methanol	e	h	<u>e</u>	<u>e</u>
75% methanol	<u>e</u>	h	<u>e</u>	<u>e</u>
70% methanol	<u>e</u>	h-e	<u>e</u>	<u>e</u>

1) zie voor de gebruikte afkortingen tabel 9 van § 2. 4. 5.

2) dit duidt op het reversibele gedrag van H. P. 4

Ook bij H.P. 4 treedt bij aanzuren van een basische oplossing in een water-aceton mengsel kleurverdieping op (Vergelijk § 2. 4. 7.). Vergelijken we de tabellen 10 en 13, dan zien we, dat H.P. 4 zelfs in basische 75% methanol nog hypophasisch is, terwijl J (een E.P. -carotenoid) met basische 85% methanol al voor ongeveer de helft epiphasisch is. H.P. 4 wordt uit een oplossing in petroleumaether sterk geadsorbeerd aan MgCO_3 en irreversibel aan Al_2O_3 . Dit laatste komt wellicht door het basische karakter van het gebruikte Al_2O_3 .

De absorptie-spectra in petroleumaether en CS_2 zijn weergegeven in fig. 14. Het carotenoid geeft in CHCl_3 met geconcentreerd H_2SO_4 , HNO_3 en SbCl_3 een grijs-blauwe kleur. In petroleumaether ontstaat met geconcentreerd H_2SO_4 een groen-blauwe kleur. Met sterk H_3PO_4 is de kleurreactie in beide oplosmiddelen negatief.

2. 4. 11. De overige H.P. -carotenoïden

H.P. 1 en H.P. 3 bleken in petroleumaether een merkwaardig absorptiemaximum te bezitten (fig. 15). Uit het feit, dat de hoeveelheden van deze kleurstoffen tijdens het chromatograferen vrij snel afnamen, concludeerden we, dat ze instabiel zijn. Van H.P. 2 zijn de absorptie-spectra in petroleumaether en CS_2 in fig. 16 weergegeven. Evenals bij H.P. 1 en H.P. 3 moesten we hier van een verdere karakterisering afzien doordat een te geringe hoeveelheid zuivere stof aanwezig was.

2. 5. *Fluorescerende componenten in de oorspronkelijke onverzeepbare lipoidfractie*

In oplossingen van de onverzeepbare lipoidfractie van de series 4 en 5, die respectievelijk asparagine en ammoniumacetaat als enige stikstof-bron hadden, werd bij belichting met U. V. licht een vrij sterke fluorescentie waargenomen. Bij een nader onderzoek met de circulaire papierchromatographie (§ 2. 3. b) toonde de onverzeepbare fractie van de 4e serie, opgelost in methanol, een in daglicht onzichtbare, echter onder de U. V. -lamp blauw-wit fluorescerende ring, die juist buiten de rode ring ($R_F \sim 80$) viel. Bij chromatografie van een oplossing van deze fractie in petroleumaether op een kolom van $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ of Al_2O_3 viel de plaats van de fluorescerende stof ongeveer samen met die van de gele (epiphasische) componenten. Bij herhalen van dezelfde proeven met de onverzeepbare fractie van de 5e serie werden op papier buiten de rode ring twee zwak gele, in U. V. -licht fluorescerende ringen waargenomen, waarvan de zwakst fluorescerende component X een $R_F \sim 80$ en de sterkst fluorescerende component Y een $R_F \sim 90$ had.

Bij chromatografie op een $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -kolom fluoresceerden alle gekleurde en ongekleurde fracties min of meer, zodat hierop dus geen scheiding verkregen wordt (in tegenstelling met de resultaten bij papierchromatographie).

Van de fluorescerende fracties X en Y op het papierchromatogram werden de absorptie-spectra in methanol bepaald na uitknippen van de ring en elutie met methanol (fig. 17). Deze fluorescerende componenten zijn waarschijnlijk in vivo voorkomende stoffen, daar ze in verse extracten waargenomen werden. De spectra van X en Y vertonen geen gelijkenis met die van phytoëen en phytoflueen, welke stoffen dikwijls naast de carotenoiden gevonden worden en waarschijnlijk voortrappen in de biogenese ervan zijn (13). Wel is er enige gelijkenis tussen de spectra van X en Y en die van de fluorescerende stoffen, die Koe, Fox en Zechmeister in diepzee-modder vonden (33). Fox, Crane en MacConnaughy beschreven enige blauw fluorescerende chromo-lipoiden uit *Thoracophelia mucronata* (een ringworm), die evenals onze component Y een absorptiemaximum bij 300 m μ vertonen (18). De vergelijking kan slechts ten dele geschieden, omdat Fox e.m. niet de spectra bij $\lambda < 300$ m μ maten. Een verdere overeenkomst van X en Y met de zojuist genoemde stoffen van Fox e.m. is het feit, dat beide groepen van stoffen zowel in de epiphase als in de hypophase voorkomen. In de onverzeepbare fracties van de massacultures, die hoofdzakelijk op glycine als N-bron gekweekt waren (series 1, 2a en de contrôleserie 2b), kon geen fluorescentie waargenomen worden.

2. 6. De isolering van enkele carotenoiden uit *Cantharellus Cinnabarinus* *)

In 1950 isoleerde Haxo (43) uit *Cantharellus Cinnabarinus* enige carotenoiden, waaronder het door hem zo genoemde canthaxanthine. Omdat wij canthaxanthine wilden vergelijken met kleurstof J uit *Polytoma uvella* werden de kleurstoffen uit deze paddestoel door ons onderzocht.

De ons door Dr. Haxo welwillend ter beschikking gestelde gedroogde paddestoelen werden, in navolging van Haxo's werkwijze voor de verse paddestoelen, met acetongeëxtraheerd tot er geen gekleurde stoffen meer opgelost werden. Uit het residu bleek toen echter met behulp van de eerder beschreven extractie-methode met methanolische KOH (§ 2. 2. 1) nog een aanzienlijke hoeveelheid kleurstof verkregen te kunnen worden.

De carotenoiden werden gescheiden in de epi- en de hypophasische fractie met petroleumaether 40°-60°C en 85% methanol.

2. 6. 1. De E. P. -carotenoiden van *Cantharellus Cinnabarinus*

De E. P. -fractie werd op een MgCO_3 -kolom gebracht en het chromatogram ontwikkeld met petroleumaether met een toenemend gehalte natte aether.

*) Wij betuigen gaarna onze dank aan Mejuffrouw W. Hofman, voor de hierbij verleende hulp.

Gerangschikt in toenemende adsorptie-affiniteit kregen we fracties, die, wat spectrum en relatieve hoeveelheden betreft, overeenkwamen met de kleurstoffen VII (β -caroteen), VI, III, IV (canthaxanthine) en V van Haxo. III, IV en V worden dus op MgCO_3 in omgekeerde volgorde ge-adsorbeerd als op $\text{MgO} + \text{Celite}$ (43). Fractie IV werd enige malen op nieuw gechromatographeerd op MgCO_3 ter verwijdering van resten van de iets sterker geadsorbeerde kleurstof V. De door ons van IV (canthaxanthine) bepaalde eigenschappen stemmen in hoofdzaak overeen met die, welke door Haxo gevonden werden *). Een uitzondering is de kleurreactie met H_3PO_4 , waarbij Haxo niets waarnam en wij een lichtblauwe kleur kregen. De door ons bepaalde absorptiemaxima in petroleumaether (40-60°C) bij 462 $\text{m}\mu$ en in CS_2 bij 502 $\text{m}\mu$ zijn practisch identiek aan de door Haxo gevonden maxima. De door Haxo gevonden van 320 $\text{m}\mu$ naar 260 $\text{m}\mu$ toenemende absorptie in petroleumaether met een zwak maximum bij 280 $\text{m}\mu$ (43) was bij ons afwezig; deze absorptie is waarschijnlijk niet karakteristiek voor canthaxanthine, maar moet worden toegeschreven aan de kleurloze verontreinigingen, die Haxo vermeldde bij de beschrijving van een microscopisch onderzoek van het vaste canthaxanthine. We wijzen er op, dat we zelf hier, evenmin als Haxo, een speciale "carotenoiden-steroiden"-scheiding toepasten, zoals we dat wel deden bij het onderzoek naar de kleurstoffen van *Polytoma uvella*.

In fig. 18 is het door Haxo niet vermelde absorptie-spectrum van kleurstof V weergegeven. Zowel uit de ligging van het absorptiemaximum ten opzichte van dat van canthaxanthine (5 $\text{m}\mu$ naar kortere golflengten) als uit de aanwezigheid van de cis-top bij $\sim 355 \text{ m}\mu$ volgt, dat deze kleurstof zeer waarschijnlijk een cis-isomeer is van canthaxanthine (een neo-canthaxanthine). Haxo veronderstelde dit reeds uit de relatieve plaats van de beide kleurstoffen op de chromatographie-kolom. Voor de absorptie-spectra en verdere beschrijvingen van de overige kleurstoffen verwijzen wij naar de publicatie van Haxo (43).

2. 6. 2. H. P. - carotenoiden uit *Cantharellus Cinnabarinus*

Tabel 14 1)

Vergelijking van Haxo's kleurstof VI met de door ons gevonden H. P. -kleurstof uit *Cantharellus Cinnabarinus*

Hypophase	Verdeling in de E. P. /H. P. -scheiding	
	H. P. -kleurstof	Haxo's kleurstof VI
95% MeOH	h	e
90% MeOH	$\overline{\text{h}}$	$\overline{\text{e}}$
95% MeOH	h-e	$\overline{\overline{\text{e}}}$

1) zie voor de gebruikte afkortingen tabel 9, § 2. 4. 5.

Het H. P. -mengsel werd overgebracht in petroleumaether en gechromatographeerd op een Al_2O_3 -kolom (activiteit 3 volgens Brockmann) met petroleumaether + toenemend gehalte natte aether als ontwikkeltvloeistof. De H. P. -fractie bleek voornamelijk uit één component te bestaan met absorptiemaxima in petroleumaether en CS_2 bij resp. 455 $\text{m}\mu$ en 490 $\text{m}\mu$. Dit carotenoid, dat door Haxo niet genoemd werd, heeft ongeveer dezelfde absorptiemaxima als VI, maar verschilt hiervan in zijn epi-py-

*) Voor de structuur van canthaxanthine zie (65).

pophasische gedrag (tabel 14), terwijl het bovendien een positieve kleur-reactie geeft (blauw-groen) met H_3PO_4 .

Het H. P. -carotenoid uit *Cantharellus Cinnabarinus* heeft geen zure eigenschappen.

Uit 3 g gedroogde paddestoelen werden 650 γ E. P. en 120 γ H. P. -carotenoiden verkregen (berekend uit $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (450 m μ) van β -caroteen = 2500). Het canthaxanthine-gehalte bedroeg ~ 75 -80% en het gehalte van elk van de overige E. P. -carotenoiden ~ 3 -5% van de totale hoeveelheid E. P.

§ 3. Materialen en methoden

3. 1. Oplosmiddelen

Aan de gebruikte oplosmiddelen werden de eisen gesteld, dat zij spectroscopisch zuiver zouden zijn en dat zij geen sterk polariseerbare (b. v. benzeen in petroleumaether) verontreinigingen zouden bevatten ¹⁾. Dergelijke verontreinigingen vergroten het verdringingsvermogen van de ontwikkelvloeistoffen in de chromatographie. Het niet-reproduceerbaar zijn van verschillende in de literatuur beschreven chromatographische experimenten is waarschijnlijk in een deel der gevallen toe te schrijven aan de aanwezigheid van onbekende hoeveelheden van de polaire verontreinigingen in de gebruikte oplosmiddelen. Voor de hieronder vermelde destillaties werd een Widmer fractioneerkolom van 1 meter lengte gebruikt.

Absolute alcohol

Alcohol (96%) werd behandeld met CaO (20) en vervolgens gedestilleerd. Werd bij controle de doorlaatbaarheidsgrens in het U. V. bij een langere golflengte dan 220-225 m μ gevonden, dan werd nog een zuivering met $Zn + KOH$ toegepast (21).

Petroleumaether (pae.)

Enkele procenten benzeen zijn in de handelskwaliteiten steeds aanwezig. De snelste methode om deze te verwijderen (vergelijk (21 en 22) bleek te zijn:

5 l petroleumaether (kp. 40°-60°C) wordt driemaal gedurende 3 uren met een verse hoeveelheid van 500 ml $H_2SO_4 + 10\% SO_3$ geroerd. Na achter-eenvolgens wassen van de petroleumaether met verdunde loog en water werd eerst gedroogd met $CaCl_2$ en daarna op Na-draad.

Hierna werd de petroleumaether gegoten door een brede kolom van grove, droge silicagel met een doorloopsnelheid van ~ 5 l per 15 minuten. Ter controle werd de extinctie bij 255 m μ (sterkste maximum van benzeen) gemeten ten opzichte van zuivere petroleumaether.

Benzeen

Deze werd thiopheen-vrij gemaakt, gedroogd en gedestilleerd (20).

Zwavelkoolstof

Na behandelen met kwik werd de zwavelkoolstof, gemengd met olijfolie, aan een destillatie onderworpen (21, 23).

Aether

Deze werd op de gebruikelijke manier peroxyde-vrij gemaakt (20), gedroogd op $CaCl_2$ en Na en vervolgens gedestilleerd.

Natte aether

Na het peroxyde-vrij maken en wassen met water werd direct gedestil-

1) Zelfs sporen van onzuiverheden kunnen al een grote fout geven, omdat tijdens de isolering en de chromatographie vrij grote volumina van de oplosmiddelen worden gebruikt voor geringe hoeveelheden van de te isoleren verbindingen.

leerd. De doorlaatbaarheid in het U. V. -gebied van zowel de droge als de natte aether ging tot 215 m μ .

Absolute methanol

Hier werd een p.a. kwaliteit van de Union Chimique Belge (U.C.B.) gebruikt, die vrijwel geen absorptie boven 220 m μ vertoonde. Gezuiverde technische kwaliteiten kunnen een absorptiemaximum bij 248 m μ vertonen (20).

Aceton

Deze werd behandeld met KMnO₄, gedroogd en gedestilleerd (20).

Water

Eenmaal met een "Stokes Automatic Model 171" apparaat gedestilleerd leidingwater werd als aqua dest. gebruikt.

3. 2. Adsorbentia

Al₂O₃ : Hiervoor werd Al₂O₃, gestandaardiseerd volgens Brockmann, van de firma Merck gebruikt. De activiteit bepaalden we door de absorptie van azo-kleurstoffen onder gestandaardiseerde omstandigheden na te gaan (9).

MgO : "heavy" kwaliteit Analar van B. D. H.

Ca(OH)₂ : p. a. van Hopkins and Williams.

CaCO₃ : van de firma Brocades, Stheeman en Pharmacia; werd gedurende 3 uur gedroogd bij 150°C (8).

Ca₃(PO₄)₂ : p. a. van Kahlbaum.

MgCO₃ : "heavy, dose 10 to 60 grains", Harker, Staggs en Morgan Ltd., Emmottstreet, London E. I., England.

De bruikbaarheid van verscheidene door ons vergeleken merken en kwaliteiten magnesium-carbonaat voor een kolom met goed scheidend vermogen was zeer verschillend. Onbruikbaar bleken alle "light" kwaliteiten. Bij de "heavy" kwaliteiten muntte het laatstgenoemde merk uit door de uitstekende resultaten, die we ermede behaalden.

Opmerking:

Van Al₂O₃ en enkele andere adsorbentia kan de activiteit o. a. worden bepaald door de bevochtigingswarmte met water te bepalen (24), of door de relatieve adsorptie van bepaalde azo-kleurstoffen na te gaan (9). Voor de meeste door ons gebruikte adsorbentia zijn hiervoor (nog) geen gegevens bekend. Het door ons gevolgde isoleringsschema zal bij herhalen van de proeven waarschijnlijk alleen dan weer precies tot eenzelfde resultaat voeren, wanneer dezelfde merken adsorbentia gebruikt worden. Men vergelijkte in dit verband de bespreking van het adsorbens MgCO₃.

3. 3. Voedingsstoffen voor de massacultures van *Polytoma*; zie hoofdstuk VIII

3. 4. Overige chemicaliën

Hiervoor werden steeds p. a. kwaliteiten gebruikt.

3. 5. Opmerkingen over de chromatographische techniek

Alle chromatographische proeven met de kolom-chromatographie werden uitgevoerd bij kunstlicht en in een stikstofatmosfeer. In de meeste

gevallen werd, tenzij anders vermeld, de "stromende chromatogram"-techniek gevolgd.

Verscheidende methoden voor het maken van de kolommen werden vergeleken. De veel gebruikte technieken (8), zoals het "insneeuwen" van het adsorbens (voor Al_2O_3 -kolommen) en het "stampen" van de kolom bleken met de door ons gebruikte adsorbentia slechte resultaten op te leveren. Homogene kolommen met constante druppelsnelheid werden (vooral met MgCO_3) verkregen door de kolommen in één keer met het adsorbens te vullen, vervolgens enige minuten met de verticaal gehouden kolom op de tafel te tikken, bij te vullen en weer te tikken. Deze kolommen krompen practisch niet bij het bevochtigen. Vóór het opbrengen van het kleurstofmengsel werden de kolommen eerst volledig bevochtigd met het oplosmiddel. De druppelsnelheid werd geregeld door middel van stikstof-overdruk (max. 7 cm kwikdruk). Deze methode verdient de voorkeur boven de onderdrukmethode (19).

3. 6. *Het meten van de absorptie-spectra*

De absorptie-spectra werden bepaald met een Beckmann spectrophotometer, model D. U. De golflengteschaal werd geijkt met een reeks lijnen uit het Hg-spectrum, aan de hand van het bij het apparaat geleverde voorschrift. De golflengte-nauwkeurigheid was voor het gebied 220-350 m μ : 0,1 à 0,2 m μ en voor het gebied 350-550 m μ : 0,3 à 0,5 m μ .

Ter verdere controle werden absorptie-spectra van lycopene en β -caroteen na voorafgaande chromatographische zuivering (25, resp. 8, 14) bepaald. Zij kwamen met een afwijking < 1 m μ overeen met de literatuurgegevens (13, 14).

Bij carotenoiden met een vlak absorptiemaximum, zoals dat in dit onderzoek vaak voorkwam bij de absorptie-spectra met één top, kon door de afleesfout en de gevoeligheidsgrens van het apparaat dit maximum niet nauwkeuriger dan tot op ~ 2 m μ bepaald worden. Wanneer we een mogelijke fout in de extinctie aannemen van $\sim \frac{1}{2}\%$ (26), vinden we b.v. voor het spectrum van kleurstof D in petroleumather (fig. 9), dat de extincties van 452 tot 456 m μ binnen de proeffout overeenstemmen, hetgeen het nauwkeurig aangeven van het maximum bemoeilijkt.

§ 4. *Discussie*

4. 1. *De scheiding van carotenoiden en steroïden*

Bij de isolering van carotenoiden wordt dikwijls de moeilijkheid ondervonden, dat deze pigmenten samen met grote hoeveelheden steroïden en (of) andere onverzeepbare lipoiden voorkomen. In de literatuur worden enkele methoden beschreven om deze bijmengsels althans gedeeltelijk te verwijderen, zoals uitvriezen (10) en herhaalde extractie van de epifase met de hypofase (36).

Ook wij ondervonden, evenals o.a. Haxo (36), dat de bijmengsels het omkristalliseren van de carotenoiden zeer bemoeilijken, terwijl de chromatographische scheiding van de carotenoiden er door gestoord kan worden.

In onze vergelijkingsproeven konden wij met uitvriezen slechts ~ 15% van het in *Polytoma uvella*-extracten aanwezige provitamine D-achtige ¹⁾ lipoid verwijderen en met 9 x uitschudden van de epiphase met de hypophase ~ 90%. Bij deze laatste methode was het verlies aan kleurstof echter ~ 50%.

Betere resultaten werden door ons verkregen door middel van de directe praecipitatie van de provitamine D-achtige steroïden met digitonine.

Aangezien de verkregen digitoniden uiteindelijk nog slechts zwak rose gekleurd waren, trad practisch geen verlies aan kleurstof op door praecipitatie of adsorptie aan de digitoniden. Toepassing van de methode op *Polytoma uvella*-extracten had tot resultaat, dat 90-95% van de carotenoiden werd teruggewonnen, terwijl 5 à 10% van de provitamine D-achtige lipoiden niet praecipiteerbaar bleken te zijn. Deze laatste genoemde hoeveelheid kwam uiteindelijk in dezelfde chromatographische fractie als kleurstof E (§ 2. 4. 5).

Het lijkt ons echter niet mogelijk om uit dit misschien toevallige feit enige conclusie te trekken. Het onderzoek van de steroïden wordt beschreven in hoofdstuk VI.

De methode van afscheiding door praecipitatie met digitonine, die, voor zover ons bekend is, nog niet eerder voor dit doel gebruikt werd, was voor ons geval voldoende, daar we practisch geen last meer hadden van kleurloze verontreinigingen in de carotenoiden-fractie.

4. 2. Hoeveelheden van de carotenoiden in *Polytoma uvella*

Tabel 15 bevat quantitatieve gegevens over de carotenoiden van *Polytoma uvella*, gekweekt op de beide glycine voedingsbodems. Vlg. tabel 21 in § 4. 6.

Het blijkt, dat er weinig verschil bestaat in carotenoidenproductie op de beide gebruikte media. De gevonden hoeveelheden corresponderen met de waarden, die opgegeven worden voor verschillende algen, die tot de Phaeophyceae en Rhodophyceae gerekend worden (13). Taxonomisch staan de *Polytoma*'s echter dichter bij de Chlorophyceae (37, 64), waar de opgegeven hoeveelheden een factor 5 à 10 hoger liggen (13). Het lijkt ons echter niet mogelijk hieruit enigerlei conclusies te trekken, omdat op dit terrein nog zo weinig gegevens bekend zijn.

1) Het U. V. absorptie-spectrum van het mengsel van kleurloze, niet verzeepbare lipoiden, die met de carotenoiden geïsoleerd werden, was gelijk aan dat van de bekende provitaminen D.

Tabel 15

De hoeveelheden van carotenen en xanthophyllen in *Polytoma uvella* op de beide media van de massacultures

Serie	Bijzonderheden	Hoeveelheden			
		mg/100 ml organismen ¹⁾		mg/100 g drooggewicht	
		caroten	xanthophyllen ²⁾	caroten	xanthophyllen
1	Vit. B ₁ toegevoegd.	1,0	3,8	7,0	27,5
2a en 2b	gistwater toegevoegd.	1,0	5,1	6,5	34,0

1) mg/100 ml = $\pm$ mg/100 g nat gewicht (13).

2) "xanthophyllen" wordt hier gebruikt als samenvatting voor alle zuurstofhoudende carotenoiden.

De verhouding hoeveelheid xanthophyllen/hoeveelheid caroten bedraagt voor de serie 1 en de series 2a en 2b respectievelijk 4 en 5. Deze waarden stemmen in orde van grootte overeen met de voor verschillende Chlorophyceae en flagellaten gevonden verhoudingen (13).

Uit de algen van de 5de serie met (0,4% NH₄ acetaat + 0,02% asparagine) als stikstofbron en zonder vitamine B₁ (vgl. tabel 1 en tabel 2 in § 2. 1) was in de onverzeepbare fractie totaal 0,2 mg carotenoiden aanwezig. In tabel 16 zijn de opbrengsten aan carotenoiden van de grote series 1, 2a, 2b, en 5 vergeleken met de carotenoid-opbrengsten in enkele cultures, die ingezet waren om de invloed van vitamine B₁ op de carotenogenese quantitatief na te gaan (vgl. hoofdstuk IX).

Tabel 16

Vergelijking van de carotenoidenproductie in enkele grote en kleine cultures van *Polytoma uvella* met en zonder vitamine B₁

grote cultuur	kleine cultuur	N-bron		B ₁	Carotenoidenopbrengst	
		NH ₄ Ac of glycine	asparagine		μ g/ml organismen	μ g/l medium
no. 5	no. 2	0,4% NH ₄ Ac	+ ~ 0,02% asp.	-	4,5	4
		0,4% NH ₄ Ac	+ ~ 0,1% asp.	-	4,0	16
	no. 14	0,2% glycine	+ ~ 0,1% asp.	-	80,-	49
	no. 18	0,2% glycine	+ ~ 0,1% asp.	B ₁		200
no. 1		0,2% glycine	+ ~ 0,02% asp.	B ₁	50,-	33
no. 2a en 2b gemiddeld.		0,2% glycine	+ ~ 0,02% asp.	gistwater	58,-	40

De reeds eerder gevonden stimulerende werking van vitamine B₁ op de carotenogenese (hoofdstuk IX) wordt dus door deze resultaten met de grote cultures gesteund. Men vergelijkte de kolom $\mu\text{g/ml}$ organismen in tabel 16. Uit de tabel blijkt verder nog, dat meer (0,1%) of minder (0,02%) asparagine zich uit in $\mu\text{g/l}$ medium en niet in $\mu\text{g/ml}$ organismen.

4. 3. De structuur van de carotenoiden in *Polytoma uvella*

Met behulp van de in het experimentele deel beschreven methoden werd een bevredigende scheiding verkregen van het carotenoidmengsel van de onverzeepbare fractie. De gele epiphasische fractie (E. P. G.) bleek te bestaan uit β -caroteen als hoofdcomponent en voor $\sim 3\%$ uit neo- β -caroteen B of een nauwverwant ander cis-isomeer van β -caroteen. Hoewel de mogelijkheid bestaat, dat dit isomeer pas in vitro door isomerisatie uit β -caroteen ontstaan is, houden we het voor zeer waarschijnlijk, dat dit cis-isomeer in *Polytoma uvella* zelf reeds voorkomt, gezien de strenge uitsluiting van daglicht, luchtzuurstof en temperatuursverhoging bij onze experimenten en het feit, dat ook in verse extracten van *Polytoma uvella* een splitsing van de caroteenfractie waargenomen werd. Ook uit enkele hogere planten hebben andere onderzoekers cis-isomeren van β -caroteen geïsoleerd (13). De rode epiphasische fractie (E. P. R.) bleek een mengsel te zijn met als hoofdcomponenten D en J. Deze zullen zo dadelijk besproken worden.

De fractie in de hypophase (H. P.), die uit zuurstof bevattende carotenoiden ("xanthophyllen") bestaat, was eveneens een mengsel, met als hoofdcomponent H. P. 4. Het is merkwaardig, dat zowel de 3 hoofdcomponenten D, J en H. P. 4, als verschillende van de andere pigmenten slechts één absorptie-maximum in het zichtbare gebied van het spectrum hebben met de verschillende oplosmiddelen. Volgens Heilbron en Lythgoe (18) wordt zo'n absorptie-spectrum veroorzaakt door de aanwezigheid van een keto-groep, die geconjugeerd is met twee reeksen van geconjugeerde dubbele bindingen. Volgens Goodwin en Taha (39) zijn er uitzonderingen op deze regel b. v. in het geval van astaxanthine (3,3' dihydroxy - 4,4' diketo- β -caroteen), waar de C=O groepen slechts met één reeks geconjugeerde dubbele bindingen geconjugeerd zijn en er toch ook slechts één absorptie-maximum is.

In tabel 17 geven we een overzicht van de tot nu toe beschreven keto-carotenoiden met één absorptie-maximum. Niet in de tabel zijn opgenomen:

- a. de door Strain e. m. gevonden verbindingen, neofucoxanthine A en B (absorptiemaximum $\sim 445/\text{m}\mu$ in 96% aethanol), die onvolledig beschreven zijn (52).

Tabel 17. Literatuuroverzicht van de epiphasische (1→5) en hypophasische

no.	carotenoid	geïsoleerd uit	absorptiemaximum in m	smpt.	epi- hypo phasisch gedrag	zure ei
1	echinenon (39) = myxo- xanthine	o.a. algen en crusta- ceae	CS ₂ : 488 (40) 488 (38) 494 (10) aethanol: 470 (38) CHCl ₃ : 473 (38) 474-476 (10) pae (40-60): 465 (38) pae (40-60): 485-460 (10) benzeen: 472-474 (10) pyridine: 478-480 (10)	178 -179° (40) 192° (40) 168 -169° (38)	90% MeOH: e	
2	haemato- xanthine (41)	Haemato- coccus pluvialis	CS ₂ : 513-515 pae. : 478 aether : 480	(205°)	90% MeOH: e 95% MeOH: e	
3	cantha- xanthine (43)	Cantharel- lus cinna- barinus	CS ₂ : 500 pae (30-60): 462 hexaan : 466 benzeen: 482	(218°)	85% MeOH: e 90% MeOH: e 95% MeOH: e-h	afw
4	"acidic pigment (36)	Neurospo- ra crassa	CS ₂ : 512-514 pae. : 479	-	90% MeOH: e 95% MeOH: e	aanwezig aanzuren epiphasis
5	Haxo's "pigment VI" (43)	Cantharel- lus cinna- barinus	CS ₂ : 494 pae (30-60): 455 hexaan : 457	-	85% MeOH: e 90% MeOH: e 95% MeOH: e	
6	astacine	o.a. crus- taceae	CS ₂ : 510 (45, 46) 500 (44) 520 (41) pyridine: 500 (46) 505 (41)	241° 228°	85% MeOH: e 90% MeOH: h	aanwezig
7	astaxanthine	phytofla- gellaten, fungi, bacteriën en inverte- braten (vooral crustaceae)	CS ₂ : 502 (44) 505-506 (47) pyridine: 490-491 (44) aceton : 475 pae. : 470	215-216°	90% MeOH: h	aanwezig
8	mytilo- xanthine (48)	Mytilus californi- cus	CS ₂ : 500	140-144°	70% MeOH: e 80% MeOH: h 85% MeOH: h 90% MeOH: h	aanwezig; bele kleur ring met l
9	glycymer- ine (42) a)	enkele mollusken	CS ₂ : 495	148-153°	hypophasisch	afwezig
10	chrysophle- ine (49, 50)	Mycobacte- rium phlei	CS ₂ : 487 aethanol: 460 pae. : 452	-	90% MeOH: h	aanwezig;
11	metridine (51)	Metridini- um senile	CS ₂ : 495 pyridine: 495	195°	-	aanwezig

a) Het bestaan van glycymerine moet in twijfel worden getrokken (14).

b) Voor de verklaring van de afkortingen zie tabel 9 in § 2.4.5.

- b. één van de desoxyluteïnes (I), die Zechmeister als degradatie-product van luteïne (xanthophyll) verkreeg. De eigenschappen van deze laatste verbinding lijken sterk op die van myxoxanthine (24).
- c. de carotenoiden, die afhankelijk van het oplosmiddel of één of meerdere absorptiemaxima kunnen hebben, zoals b.v. peridine (52) en siphona-xanthine (53).



Astaxanthine

Wat de in de tabel genoemde carotenoiden betreft, willen we nog de aandacht vestigen op de grote overeenkomst, die bestaat tussen haematoxanthine (41) en Haxo's "acidic pigment" (36), zowel wat betreft de absorptiemaxima in verschillende oplosmiddelen als de overige eigenschappen.

4. 3. 1. Kleurstof D

Wanneer we de eigenschappen van onze epiphasische kleurstof D (zie § 2. 4. 6) vergelijken met die van de epiphasische carotenoiden in tabel 17, dan zijn o.i. alleen myxoxanthine en Haxo's "pigment VI" met D vergelijkbaar. D is een neutrale

Tabel 18

Vergelijking van de ligging der absorptiemaxima van myxoxanthine, Haxo's "pigment VI" en onze kleurstof D

Oplosmiddelen	Absorptiemaxima in mμ 1)		
	myxoxanthine	Haxo's "pigment VI"	Kleurstof D
petroleumaether 40°-60°	465; 458-460	455	454
petroleumaether 80°-100°	-	-	457
hexaan	-	457	-
aethanol	470	-	458-465
CHCl ₃	473; 474-476	-	468
benzeen	472-474	-	473
CS ₂	488; 494	494	490

1) Nauwkeurigheid ~ 2 mμ (vgl. § 3. 6).

Het teken ; scheidt de opgegeven waarden van verschillende auteurs. 458-460 enz. duidt een traject aan. De waarden voor myxoxanthine zijn aan de literatuur ontleend.

kleurstof, terwijl we voor de beide andere kleurstoffen door gebrek aan nadere gegevens slechts kunnen concluderen, dan deze misschien ook neutraal zijn. Verder is er een redelijke overeenstemming tussen de ligging van de absorptiemaxima van de drie genoemde kleurstoffen in verschillende oplosmiddelen (zie tabel 18), als men in aanmerking neemt de in het algemeen voorkomende spreiding in opgegeven waarden voor de absorptiemaxima van één carotenoid door verschillende auteurs.

Verder is er een redelijke overeenkomst tussen de andere eigenschappen (vgl. § 2. 4. 6 en tabel 17).

Mengchromatogrammen van kleurstof D en Haxo's "pigment VI" (geïsoleerd uit *Cantharellus Cinnabarinus*; vgl. § 2. 6. 1) toonden echter aan, dat deze beide kleurstoffen niet identiek waren. Aangezien wij niet op korte termijn over myxoxanthine konden beschikken, was het helaas niet mogelijk een mengchromatogram met D te maken. Wij komen tot de conclusie, dat pigment D waarschijnlijk nauw verwant is aan myxoxanthine. Voor een mogelijke structuur van myxoxanthine (=echinon) vergelijk men Karrer en Rutschmann (64).

4. 3. 2. Kleurstof J

Als we letten op de zure eigenschappen en de absorptiemaxima, komt geen enkele van de bekende epiphasische keto-carotenoiden overeen met kleurstof J. Vgl. tabel 17 en de beschrijving van J in § 2. 4. 7. Merkwaardig is echter, dat de absorptiemaxima van het (epiphasische) canthaxanthine en de (epiphasische) kleurstof J in 4 oplosmiddelen gelijk zijn (tabel 19).

Kleurstof J heeft echter zwak zure eigenschappen en canthaxanthine niet. Ook de smeltpunten zijn verschillend, nl resp. 173-176°C en 218°C.

Teneinde de resultaten van Haxo, speciaal wat betreft de niet zure eigenschappen van canthaxanthine te verifiëren, werd canthaxanthine door ons uit (gedroogde) *Cantharellus Cinnabarinus* geïsoleerd en onderzocht. De door Haxo opgegeven kenmerken konden worden bevestigd (zie § 2. 6. 1).

Een mengchromatogram van canthaxanthine en kleurstof J bevestigde dat de beide carotenoiden niet identiek zijn.

Op een kolom met MgO_3 als adsorbens, was canthaxanthine langzaam te verplaatsen met pae. + 5% natte aether, terwijl kleurstof J bovenaan geadsorbeerd bleef.

Dat kleurstof J geen "cis-top" vertoont bij isomerisatie met jodium, zou zijn oorzaak kunnen vinden in het feit, dat eventuele (niet noodzakelijke thermolabiele) cis-configuraties sterisch gehinderd zijn. Zechmeister wijst er op, dat deze con-

Tabel 19

Vergelijking van de absorptiemaxima van canthaxanthine en kleurstof J in 4 oplosmiddelen

Oplosmiddel	Absorptiemaxima in $m\mu$ ¹⁾	
	canthaxanthine	kleurstof J
petroleumaether 40-60°	462	462
hexaan	466	462-464
benzeen	482	481
CS ₂	500	501

1) Nauwkeurigheid $\pm 2 m\mu$ (vgl. § 3. 6)

figuraties zelden ontstaan bij jodium-katalyse en er zelfs meestal door verdwijnen uit de oplossing (2).

Volgens Zechmeister en Wallcave vertoont ook geen der configuraties van dehydro- β -caroteen en enige soortgelijke verbindingen met een retro-structuur (enkele band in het centrum, maar een dubbele band tussen de hydro-aromatische ring en de hoofdaliphatische keten) een cis-top (2,5). Een verklaring is hiervoor nog niet gegeven.

Kleurstof J is dus een nog niet eerder beschreven epiphasisch, betrekkelijk stabiel carotenoid met zwak zure eigenschappen ¹⁾. Waarschijnlijk hangt het zure karakter evenals bij astaxanthine, chrysophleïne e. a. samen met een enol-keto tautomerie.

Omdat de structuur van het molecuul nog niet bekend is en dus een systematische naam niet opgesteld kan worden, stellen wij voor in overeenstemming met recente suggesties van een A. C. S. commissie (60) de nieuwe kleurstof polytomaxanthine te noemen. Voor een verdere beschrijving van polytomaxanthine (kleurstof J) verwijzen we naar het experimentele deel.

4. 3. 3. H. P. 4 en de overige pigmenten

De eigenschappen van het voornaamste hypophasische pigment H. P. 4 komen het meeste overeen met die van chrysophleïne en het minder goed beschreven metridine (vgl. tabel 17 in § 4. 3). Het absorptiemaximum van H. P. 4 in CS₂ ligt juist tussen de opgegeven maxima van de zojuist genoemde carote-

1) Naast de aanwezigheid van één absorptiemaximum wijzen ook de kleurverschillen in zuur en basisch milieu en de kleurverdieping in polaire oplosmiddelen op de aanwezigheid van keto-groepen.

noiden in. H.P. 4 is waarschijnlijk sterk verwant, maar niet gelijk aan chrysophleine, eventueel metridine. De overige pigmenten uit de epi- en de hypophase konden door de geringe geïsoleerde hoeveelheden niet nader geïdentificeerd worden. Misschien bestaan ze gedeeltelijk uit ontledingsproducten of cis-isomeren van de hoofdcomponenten.

4. 4. Resultaten met de controle-serie 2b *)

Bij het onderzoek van de carotenoiden van serie 2b, waarbij alleen de vier voornaamste pigmenten in zuivere toestand werden geïsoleerd, konden de bovenbeschreven resultaten worden bevestigd. De analyse van de epifasische pigmenten kon vereenvoudigd worden door de epifase vóór de chromatographie enige malen uit te schudden met basische methanol 90%, waardoor polytomaxanthine (kleurstof J) uit de epifase werd verwijderd.

Hierna konden de beide andere hoofdcomponenten van de epifase, nl. kleurstof D en β -caroteen, snel gescheiden worden door middel van chromatographie op $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, terwijl de hypophase de vierde hoofdcomponent, nl. HP4, bevatte. Een snelle scheiding van de carotenoiden van *Polytoma uvella* in vier fracties, die elk één der vier voornaamste carotenoiden als hoofdbestanddeel bevatten, is nu dus mogelijk. In tabel 20 hebben we de relatieve ligging op een chromatographie-kolom met MgCO_3 als adsorbens aangegeven voor deze vier hoofdcomponenten samen met neo- β -caroteen-B en drie carotenoiden uit *Cantharellus Cinnabarinus*. Verder zijn in de tabel aangegeven de gewichtsverhoudingen van de vier hoofdcomponenten en neo- β -caroteen-B in *Polytoma uvella*.

*) Voor kwantitatieve gegevens zie tabellen 1 en 2 in § 2.1 en tabel 5 in § 2.4.1.

Tabel 20

Relatieve adsorptie-affiniteiten van carotenoiden uit *Polytoma uvella* en enige carotenoiden uit *Cantharellus Cinnabarinus*

relatieve ligging op MgCO_3 1)	voorkomen		percentage v. d. <i>Polytoma</i> carotenoiden 2)	
	Pol.	Canth. C	serie 1 en 2a	serie 2b
Kleurstof HP4			~ 7%	-
Polytomaxanthine	"		~ 50%	~ 40%
"Pigment V"	"	"	-	-
Canthaxanthine		"	-	-
"Pigment VI"		"	-	-
Kleurstof D	"		15 à 20%	-
β -caroteen	"		15 à 20%	~ 15%
neo- β -caroteen	"		~ 0,5%	-

1) De volgorde is in afnemende adsorptie-affiniteit

2) De percentages zijn een benadering; aangenomen wordt, dat het verlies voor alle kleurstoffen uit *Polytoma uvella* relatief even groot was en dat geen kleurstoffen volledig verloren gingen tijdens de isolering en de scheiding.

4. 5. *Vergelijking van de carotenoiden in Polytoma uvella met die van de carotenoiden in verschillende algen*

Het o.a. in algen vrij algemeen voorkomende β -caroteen (13) bleek ook in *Polytoma uvella* aanwezig te zijn. Evenals in een andere phytoflagellaat, nl. *Haematococcus pluvialis*, en in diverse Myxophyceae komt in *Polytoma uvella* misschien myxoxanthine of een nauw verwante verbinding (kleurstof D) voor. *Polytoma uvella* mist het in Phaeophyceae algemeen voorkomende fucoxanthine en het in vele algen gevonden luteïne.

In verschillende andere phytoflagellaten (*Euglena*-soorten en *Haematococcus pluvialis*) is als voornaamste pigment astaxanthine aangetroffen (61), waaruit door Heilbron de conclusie werd getrokken, dat dit feit eveneens aanwijzingen verschaft, dat de flagellaten phylogenetisch een positie innemen tussen het planten- en dierenrijk in (59). Astaxanthine komt nl. verder veelvuldig voor in de schimmels (13) en in enkele bacteriën en anderzijds in zeedieren, zoals o.a. de Crustaceae. *Polytoma uvella* bevat echter als voornaamste pigment polytomaxanthine, dat enerzijds was betreft de absorptiemaxima, de adsorptieve eigenschappen, enz., sterk lijkt op astaxanthine, maar anderzijds wat betreft de oplosbaarheden, enige specifieke kleurreacties en de zwakkere zure eigenschappen sterk afwijkt zowel van astaxanthine als van het hieruit gemakkelijk (in vitro) gevormde astacine.

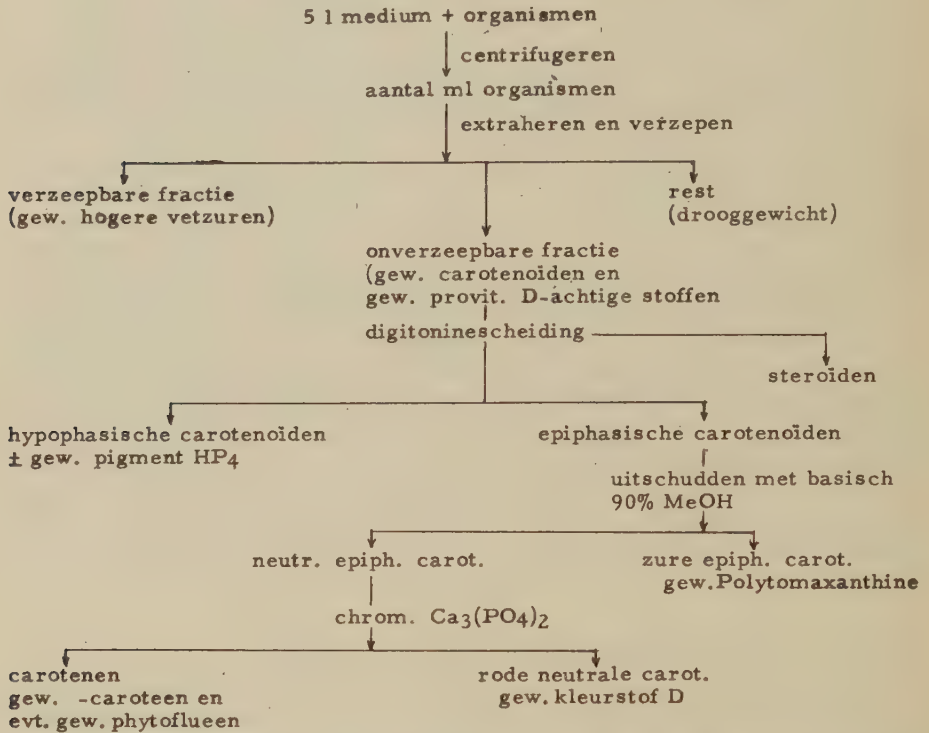
4. 6. *De carotenogenese bij Polytoma uvella*

Terwijl we voor de carotenogenese in het algemeen naar de literatuur (13, 29) en voor de invloed van thiamine naar hoofdstuk IX verwijzen, zijn er enkele problemen, die speciaal bij *Polytoma uvella* interessant zijn.

In de inleiding hebben we er reeds op gewezen, dat de voor het oog sterk pigmentvorming in een groeiende cultuur samenvalt met de tijd, waarin de uit isogameten gevormde zygoten bezinken. Het probleem is nu, of in deze periode de carotenoidenproductie pas goed begint, of dat door bio-oxydatie reeds aanwezige carotenen worden omgezet in de meer gekleurde "xanthophyllen". Uit het voorgaande bleek, dat de voornaamste carotenoiden van *Polytoma uvella* voor 20% uit carotenen en 80% uit xanthophyllen bestaan. Dergelijke bio-oxydaties zijn reeds geponeerd voor de carotenoiden-productie in tomaten (54) en *Rhodotorula rubra* (55), terwijl Turian voor *Mycobacterium phlei* door quantitatief onderzoek bewees, dat het daarin aanwezige zure "xanthophyll", chrysophleïne ontstaat uit neutrale carotenoiden en dat deze oxydatie geremd wordt door diphenylamine (56). Een nauw hiermede samenhan-

Tabel 21

Voorgesteld schema voor een snelle analyse van de voornaamste carotenoiden in *Polytoma uvella* ¹⁾ in verband met de studie van de carotenogenese



1) voor details vergelijkte men de eerder beschreven uitgewerkte methoden in § 2. 2. en § 2. 4.

gend probleem voor *Polytoma uvella* is, of de sterke pigmentvorming een noodzakelijke voorwaarde is voor het kunnen overgaan in het ruststadium, waarin b.v. een speciaal zuurstofreservoir, ontstaan door de oxydatie van carotenen tot xanthophyllen, nodig zou kunnen zijn. Het feit, dat de bezonken *Polytoma*'s in een cultuur na enkele maanden verbleken, zou in die richting kunnen wijzen. In de literatuur worden nl. verschillende experimenten en theorieën in verband met de veronderstelde reversibele binding van zuurstof aan carotenoiden en de functie van carotenoiden als zuurstofdragers vermeld, die echter dikwijls een speculatief karakter dragen (13, 57). Dat door ons in de massacultures met glycine als stikstofbron de algemeen als voortrappen aangenomen stoffen phytoëen en phytofluëen niet gevonden werden, zou veroorzaakt kunnen

worden door het feit, dat op het tijdstip van opwerken, d. i. direct na de intrede van het ruststadium deze voortrappen reeds volledig omgezet waren in carotenoiden.

Het eerste van de genoemde problemen kan waarschijnlijk worden opgelost door de carotenoidensamenstelling van *Polytoma uvella* op verschillende tijdstippen voor en na de zygotenvorming na te gaan. *Polytoma uvella* leent zich o. i. goed voor de bestudering van de carotenogenese, doordat het groeit op een eenvoudige koolstofbron en een eenvoudige stikstofbron, zonder dat verdere organische stoffen (vitamines) noodzakelijk zijn. Ook de relatief lange groeitijd is in dit verband een voordeel. Van een cultuur, groot 150 l zou b. v. telkens 5 l kunnen worden opgewerkt volgens het schema van tabel 21 en wel met tussenpozen van twee dagen van het tijdstip van enten af tot aan het bezinken, tussenpozen van een dag gedurende de daarop volgende week en tenslotte met onderbrekingen van drie à vijf dagen gedurende nog een paar weken, zodat in totaal een periode van twee à drie maanden bestudeerd werd.

Het tweede probleem, nl. of de vorming van geoxygeneerde pigmenten noodzakelijk is voor de rustphase van *Polytoma uvella*, zou b. v. met diphenylamine als mogelijke remstof (56) bestudeerd kunnen worden.

5. Samenvatting

1. Het belang van onderzoeken over de carotenoiden en de carotenogenese in phytoflagellaten werd besproken.
2. Massacultures van de phytoflagellaat *Polytoma uvella* werden op enkele media gekweekt en de gevormde lipoiden geïsoleerd.
3. Uit een kwantitatief onderzoek naar de scheiding van carotenoiden en steroiden, van de onverzeepbare fractie bleek, dat onbevredigende resultaten worden verkregen met het uitvriezen van de steroiden en de toepassing van gefractioneerde extractie. Goede resultaten werden verkregen bij rechtstreekse praecipitatie van de steroiden met digitonine. De algemene toepasbaarheid van deze methode werd besproken.
4. Twee chromatographische micromethoden, nl. de circulaire platenmethode voor poedervormige adsorbentia en de circulaire papierchromatographie, werden iets gewijzigd en gebruikt om snel een indruk te krijgen betreffende de gecompliceerdheid van en de verschillende adsorptie-affiniteiten in een carotenoidenmengsel en de geschiktheid van verscheidene adsorbentia en ontwikkelvloeistoffen voor de scheiding van het mengsel.
5. Een kwantitatief onderzoek naar de carotenoiden van *Polytoma uvella* wees uit, dat de hoeveelheden van de caroten en de xanthophyllen corresponderen met die in Phaeophyceae

- en Rhodophyceae, terwijl de verhouding gew. xanthophyllen
gew. carotenen overeenkomt met die in verscheidene andere flagellaten. Tus-
sen media met vitamine B₁ en met gistwater werd geen uitge-
sproken verschil in invloed op de carotenoidenproductie ge-
vonden.
6. De carotenoiden van *Polytoma uvella* vormen een complex
mengsel, waarin keto(?) carotenoiden de grootste fractie vor-
men. De voornaamste pigmenten zijn: een nieuw epiphasisch,
zwak zuur carotenoid, waarvoor de naam polytomaxanthine
wordt voorgesteld (40-50% van de totale hoeveelheid), β -caro-
teen (15-20%), een pigment, dat waarschijnlijk identiek is met
of nauw verwant aan myxoxanthine (15-20%) en een op chryso-
phleïne lijkend hypophasisch pigment (7%). De beide eerst ge-
noemde carotenoiden werden kristallijn verkregen. Fysische
en chemische eigenschappen van deze vier pigmenten werden
bepaald. De kleurstoffen werden met die van verschillende al-
genklassen vergeleken. Verder werden nog elf andere pigmen-
ten in kleine hoeveelheden gevonden, waarvan één met vrij
grote zekerheid werd geïdentificeerd als neo- β -caroteen-B
(0,5%), terwijl de overige misschien gedeeltelijk ontledings-
producten en (of) cis-isomeren zijn van de hoofdcomponenten.
7. Het feit, dat *Polytoma uvella* het zure keto(?) carotenoid po-
lytomaxanthine bevat en niet het bij andere phytoflagellaten
gevonden astaxanthine, werd besproken.
8. Een overzicht en een korte discussie werden gegeven van
de in de literatuur beschreven carotenoiden met één ab-
sorptiemaximum.
9. In extracten van *Polytoma*'s, die gekweekt waren op media
met asparagine of ammoniumacetaat als stikstofbron, wer-
den enige fluorescerende stoffen aangetroffen. Deze stoffen
waren niet gelijk aan phytoëen en phytoflueen. Ze werden niet
in de organismen aangetroffen, als glycine als stikstofbron
gebruikt was.
10. In verband met de frappante overeenkomst in enkele eigen-
schappen tussen polytomaxanthine en canthaxanthine werd
het laatste pigment geïsoleerd uit het carotenoidenmengsel van
Cantharellus Cinnabarinus volgens een gewijzigde methode.
Hierbij werden de resultaten van Haxo grotendeels bevestigd,
terwijl aanvullende gegevens over canthaxanthine, Haxo's
"pigment V" en een niet door Haxo genoemd hypophasisch pig-
ment uit de *Cantharellus* werden verkregen.
11. Adsorbentia en ontwikkelvloeistoffen, die voor de chroma-
tographische analyse van de pigmenten uit *Polytoma uvel-
la* en *Cantharellus Cinnabarinus* goede resultaten opleverden,
werden besproken. De zuivering van de gebruikte oplosmidde-
len en de ijking en de nauwkeurigheid van de gemeten absorp-
tie-spectra werden vermeld.
12. Suggesties werden gedaan betreffende een nader onderzoek
van de carotenogene en de eventuele functie van de
(zuurstof-bevattende) carotenoiden van *Polytoma uvella*.

1. Links, J., Verloop, A. en Havinga, E.; Comm. 8th Intern. Bot. Congress, Section 17, Paris (1954).
2. Zechmeister, L.; *Experientia* 10, 1 (1954).
3. Rosenberg, R. R.; *Chemistry and Physiology of the Vitamins*. Interscience Publishers, New York (1945).
4. Fieser, L. F. and Fieser, M.; *Natural Products related to Phenanthrene*. Reinhold Publ., New York (1949).
5. Zechmeister, L. en Wallcave, L.; *J. Am. Chem. Soc.* 75, 5341 (1953).
6. Haslewood, G. A. D.; *Biochem. J.* 41, 639 (1947).
Waghorne, D. en Ball, C. D.; *Anal. Chem.* 24, 560 (1952).
7. Williams, T. J.; *Introduction to Chromatography*. Blackie and Son, London (1948).
8. Strain, H. H.; *Chromatographic Adsorption Analysis*. Interscience Publ., New York (1945).
9. Brockmann, H. en Schodder, H.; *Ber.* 74B, 73 (1941).
Brockmann, H.; *Disc. Far. Society*, 7, 58 (1949).
10. Goodwin, T. W. en Taha, M. M.; *Biochem. J.* 47, 244 (1950).
11. Rutter, L.; *Nature* 161, 435 (1948).
12. Consden, R., Gordon, A. H. en Martin, A. J. B.; *Biochem. J.* 38, 227 (1944).
13. Goodwin, T. W.; *The Comparative Biochemistry of the Carotenoids*. Chapman and Hall Ltd., London (1952).
14. Karrer, P. en Jucker, E.; *Carotenoide*. Birkhauser, Basel (1948).
15. Zechmeister, L.; *Stereoisomeric Provitamines A. Vitamines and Hormones*, 8, 57 (1949).
16. Polgar, A. en Zechmeister, L.; *J. Am. Chem. Soc.* 64, 1856 (1942).
17. Bickoff, E. M., White, L. M., Bevenue, A. en Williams K. T.; *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* 31, 633 (1948).
18. Fox, D. L., Crane, S. C., MacConnaughey, B. H.; *J. Marine Research* 8, 3 (1948).
19. Reichstein, T. en Shoppee, C. W.; *Disc. Far. Soc.* 7, 305 (1949).
20. Vogel, A. J.; *Textbook of Practical Organic Chemistry*. Longmans, Green and Co., London (1948).
21. Pestemer, M.; *Angew. Chemie*, 63, 118 (1951).
22. Graff, M. M., O'Connor, R. T. en Skau, E. L.; *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* 16, 556 (1944).
23. Bernhauer, K.; *Einführung in die Org. Chem. Laboratoriumstechnik*. Springer, Wien (1947).
24. Müller, P. B.; *Helv. Chim. Acta* 26, 1945 (1943) en 27, 404 (1944).

25. Sandoval, A. en Zechmeister, L.; Biochemical Preparations 1, 57 (1949), Wiley en Co. New York.
26. Loofbourow, J. R.; Vitamins and Hormones 1, 109 (1943).
27. Pringsheim, E. G.; Pure culture of algae. Univ. Press. Cambridge, Engl. (1946).
28. Lwoff, A. ; Hoofdstuk I in Lwoff, A. (red.), Biochemistry and Physiology of Protozoa, Vol. I. Acad. Press, New York (1951).
29. Bonner, J. ; Plant Biochemistry. Acad. Press, New York (1950).
30. Pringsheim, E. G.; Planta, Arch. f. wiss. Bot. 1, 583 (1926).
31. Kuhn, R., Moewus, F. en Jerchel, D.; Ber. 71, 1541 (1938).
32. Moewus, F. ; J. wiss. Bot. 86, 753 (1938).
Moewus, F. ; Biol. Zentralblatt, 69, 40 (1939).
33. Koe, B. K., Fox, D. L. en Zechmeister, L.; Arch. Biochem. 27, 449 (1950).
34. Kudo, A. A. ; Handbook of Protozoology. Bailliere, Tindall, Cox, London (1939).
35. Hutner, S. H. en Provasoli, L. ; Hoofdstuk 2 in Lwoff A (red.), Biochem. and Physiology of Protozoa, Vol. I. Acad. Press, New York (1951).
36. Haxo, F. ; Arch. Biochem. 20, 400 (1949).
37. Fritsch, F. E. ; Structure and Reproduction of Algae, Vol. I Univ. Press, Cambridge, England (1948).
38. Heilbron, J. M. en Lythgoe, B.; J. Chem. Soc. 1376 (1936).
39. Goodwin, T. W. en Taha, M. M.; Biochem. J. 48, 513 (1951).
40. Léderer, E. ; C. R. Acad. Sci.; Paris 201, 300 (1935).
41. Tischer, J. ; Hoppe Seyl. Z. 250, 147 (1937).
252, 225 (1937).
281, 143 (1944).
42. Léderer, E. ; C. R. Soc. Biol. 113, 1391 (1933).
Bull. Soc. Chim. Biol. 16, 105 (1934).
43. Haxo, F. ; Bot. Gaz. 112, 228 (1950).
44. Goodwin, T. W. en Srisukh, S.; Biochem. J. 45, 263 en 268 (1949).
45. Kuhn, R. ; Ber. 72, 1688 (1939).
46. Karrer, P. en Benz, F.; Helv. Chim. Acta 17, 412 (1934).
47. Kuhn, R. en Sörensen, N. A.; Ber. 71, 1879 (1938).
48. Scheer, B. T. ; J. Biol. Chem. 136, 275 (1940).
49. Turian, G. ; Arch. Sci. Soc. Phys. Hist. Nat. Genève, 3, 79 (1950).
50. Turian, G. ; Helv. Chim. Acta 33, 1303 (1950).
51. Fox, D. L. en Pautin, C. F. A. ; Phil. Trans. Roy. Soc. B 230, 415 (1941).
52. Strain, H. H. ; Biol. Bull. Woods Hole 86, 169 (1944).
53. Strain, H. H.; in Franck, J. F. en Loomis, W. E.; Photosynthesis in Plants. Iowa State College Press., Ames (1949).

54. Porter, J. W. en Lincoln, R. E. ; Arch. Biochem. 27, 390 (1950).
55. Bonner, J. Sandoval, A., Tang, Y. W. en Zechmeister, L. ; Arch. Biochem. 10, 113 (1946).
56. Turian, G. ; Helv. Chim. Acta 33, 1988 en 34, 1060 (1951). Experientia, 8, 302 (1952).
57. Smirnow, A. J. ; Doklady Akad. Nauk. S.S.S.R., 73, 609 (1950), ref. C.A. 45, 773 (1951).
58. Zechmeister, L. ; Chem. Rev. 34, 267 (1944).
59. Heilbron, J. M. ; J. Chem. Soc. 79 (1942).
60. Comm. on Biochem. Nomenclature; Chem. Eng. News 24, 1235 (1946).
61. Wald, G. ; Vitamines and Hormones 1, 195 (1943).
62. Fromageot, C. en Tchang, J. L. ; Archiv. Protistenk. 9, 424 (1938).
63. Strehlow, K. ; Z. Bot. 21, 663 (1929).
64. Karrer, P. en Rutschmann, J. ; Helv. Chim. Acta 27, 1691 (1944).
65. Saperstein, S. en Starr, M. P. ; Biochem. J. 57, 273 (1954)

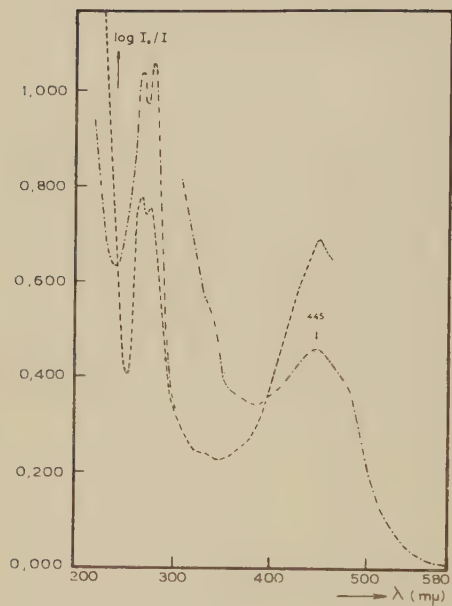


Fig. 1. 1a (---): Absorptiespectrum van de onverzeepbare fractie van serie 1 in petroleumaether 40°-60° (zie § 2.2.2.), 1b (-.-): Absorptiespectrum van de onverzeepbare fractie van serie 1 na enige malen uitschudden van de oplossing in petroleum-aether (40°-60°) met 90% methanol (zie § 2.2.2.).

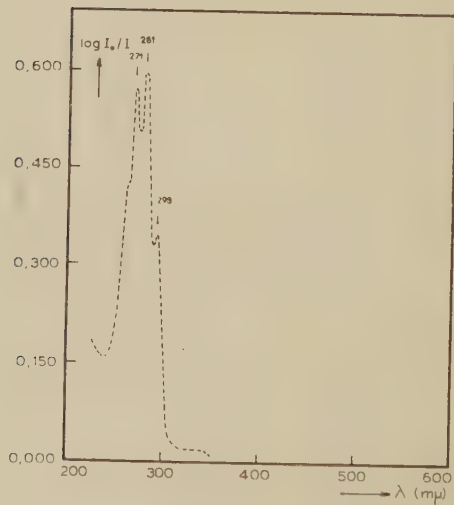


Fig. 2. Ultraviolet absorptiespectrum van het steroidenmengsel, verkregen door uitvriezen in methanol (zie § 2.2.2.).

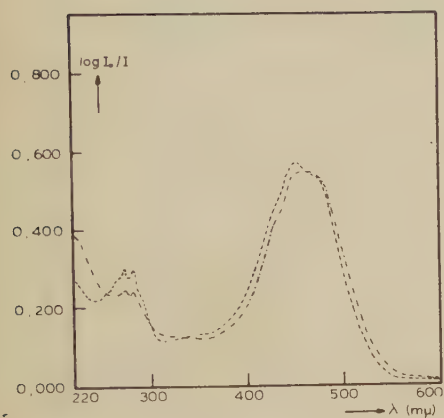


Fig. 3. Absorptiespectra van de epifase van serie 1 (---) en van de epifase van serie 2a (-.-.-) in petroleumaether (40°-60°) (zie § 2.2.2.).

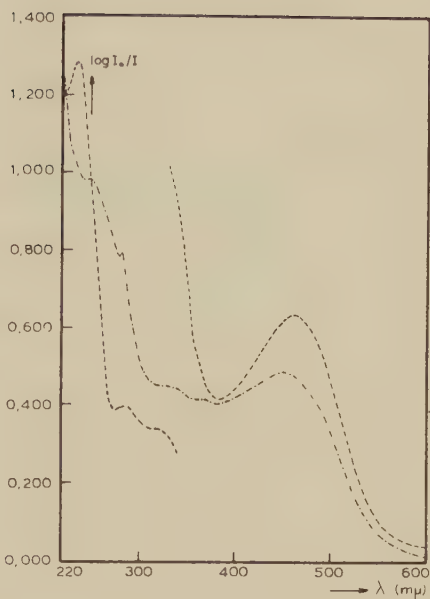


Fig. 4. Absorptiespectra van de hypophasen van serie 1 (-.-) en serie 2a (---) in 90% methanol (zie § 2.2.2.).

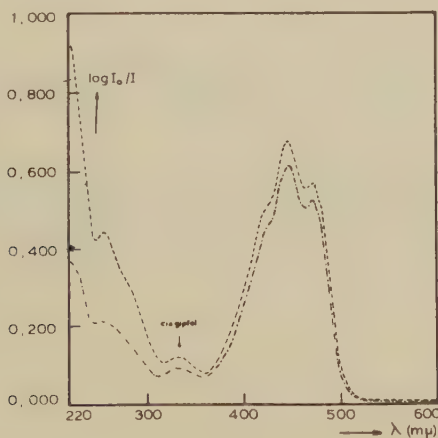


Fig. 5. Absorptiespectra van de gele epifasische fracties (E.P.G.) van de series 1 (-.-) en 2a (---) in petroleumaether (40°-60°) (zie § 2.4.1.).

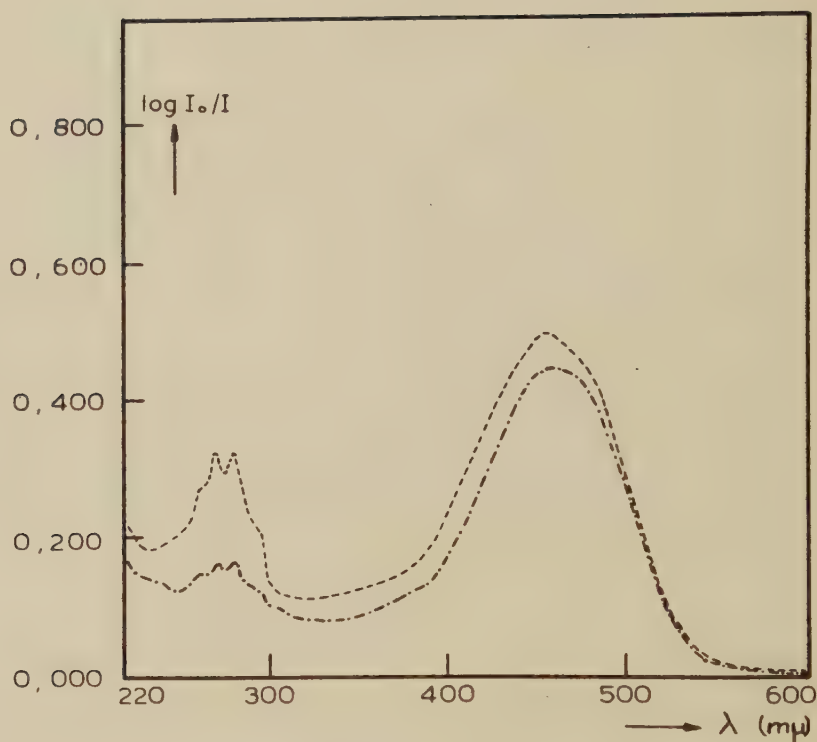


Fig. 6. Absorptiespectra van de rode epifasische fracties (E. P. R.) en van de series 1 (---) en 2a (in petroleumaether (40°-60°) (zie § 2.4.1.).

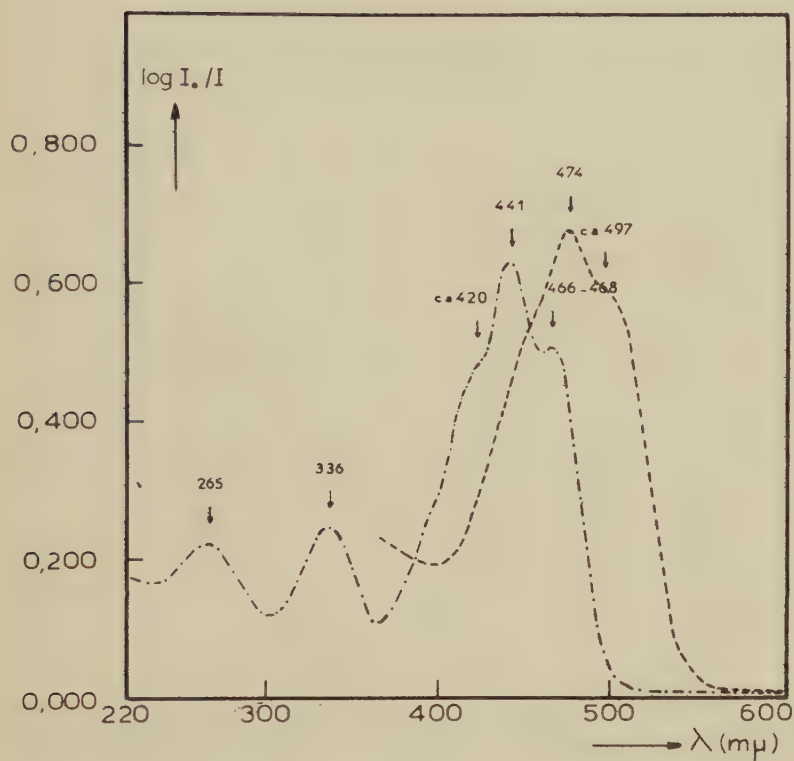


Fig. 7. Absorptiespectra van kleurstof A in petroleumæther (40°-60°) (---) en CS_2 (--) zie § 2.4.3.)

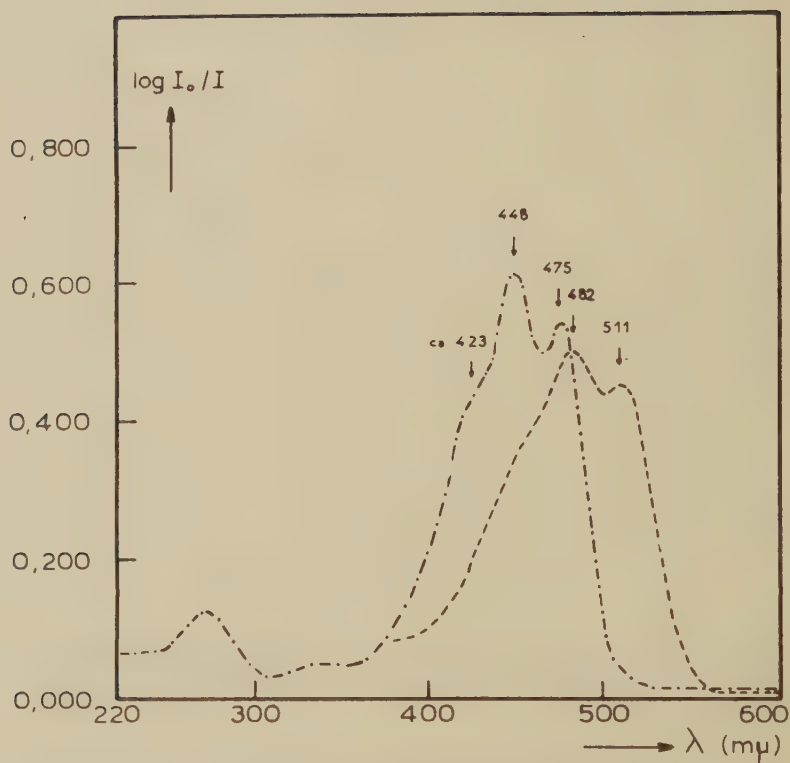


Fig. 8. Absorptiespectra van kleurstof B in petroleumether (40°-60°) (---) en in CS_2 (-.-) (zie § 2.4.4.).

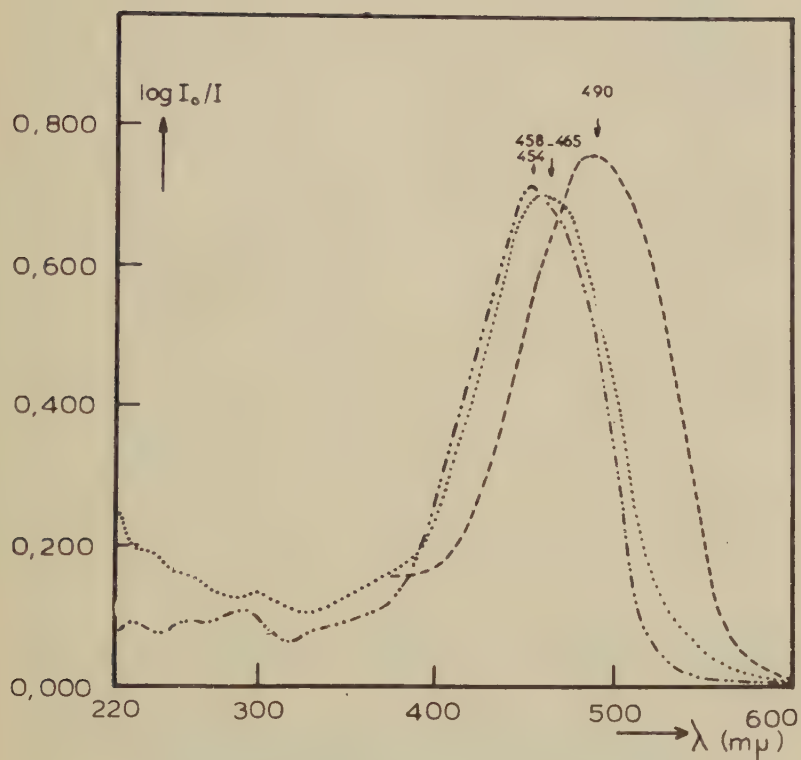


Fig. 9. Absorptiespectra van kleurstof D in petroleum-aether (40°-60°) (---), CS₂ (---) en absolute aethanol (...) (zie § 2.4.6.).

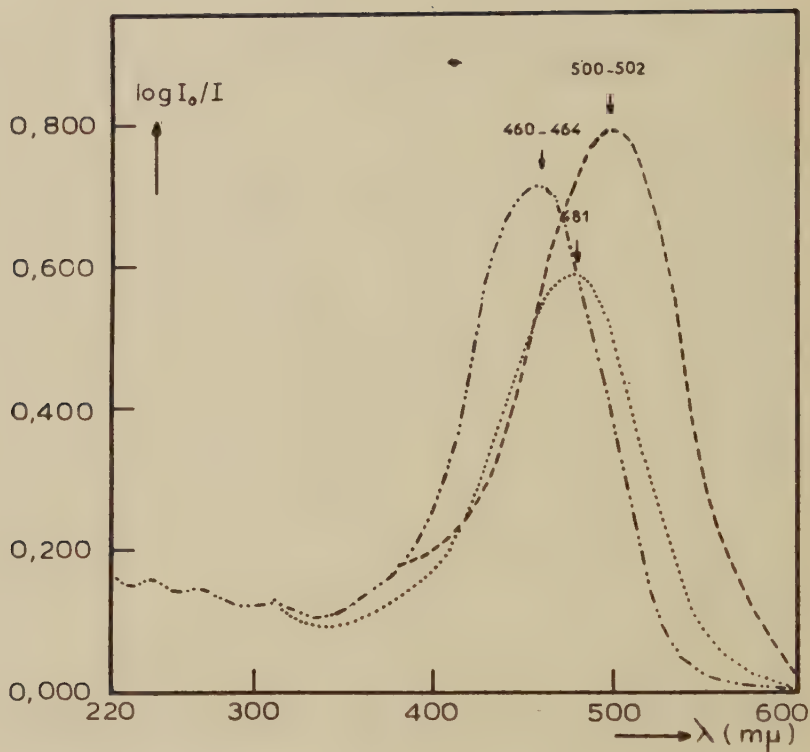


Fig. 10. Absorptiespectra van kleurstof J in petroleumether (40°-60°) (-.-), benzeen(...) en CS₂ (---) (zie § 2.4.7.).

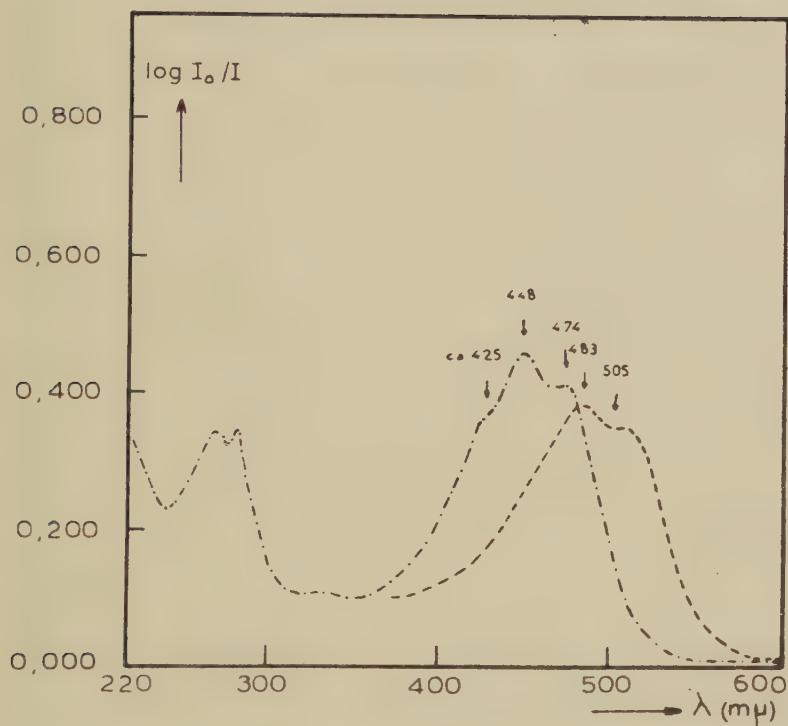


Fig. 11. Absorptiespectra van kleurstof E in petroleumæther (40°-60°) (—) en in CS_2 (---) (zie § 2, 4.8.).

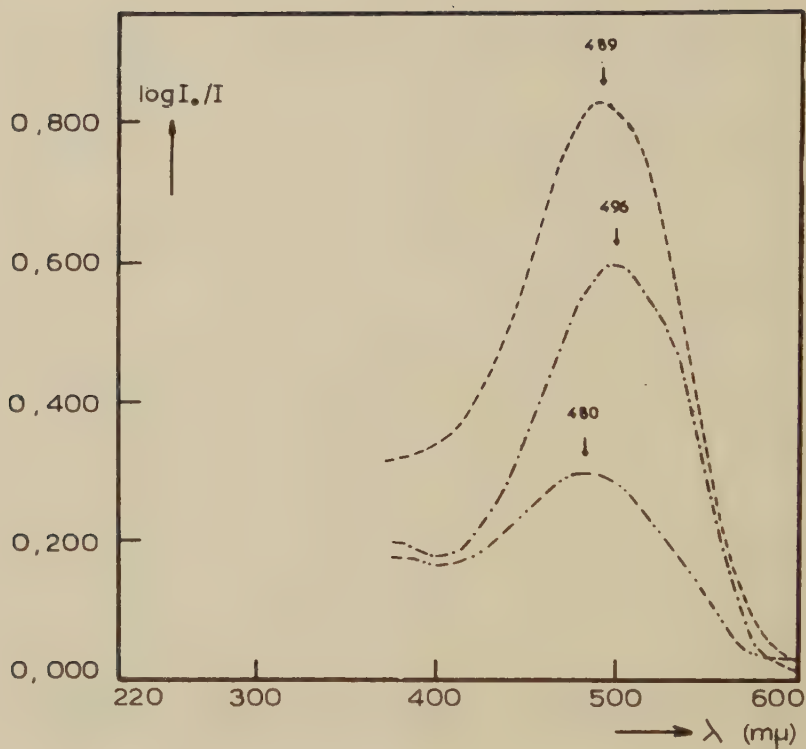


Fig. 12. Absorptiespectra van de kleurstoffen G (---), G^I (-.-) en H (---) in CS₂ (zie § 2.4.8.).

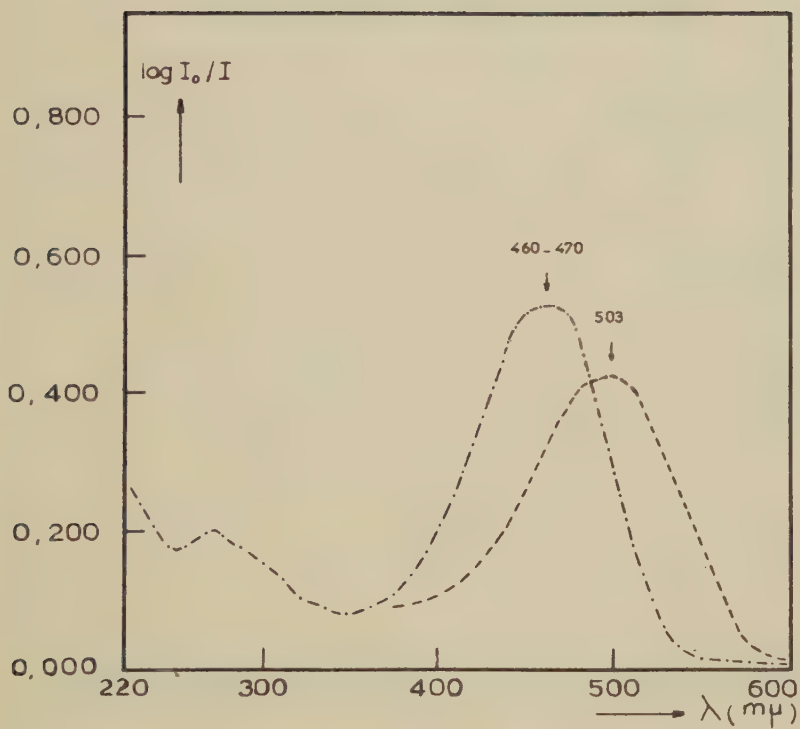


Fig. 13. Absorptiespectra van kleurstof I in petroleumether (40°-60°) (---) en in CS_2 (--) (zie § 2.4.8.).

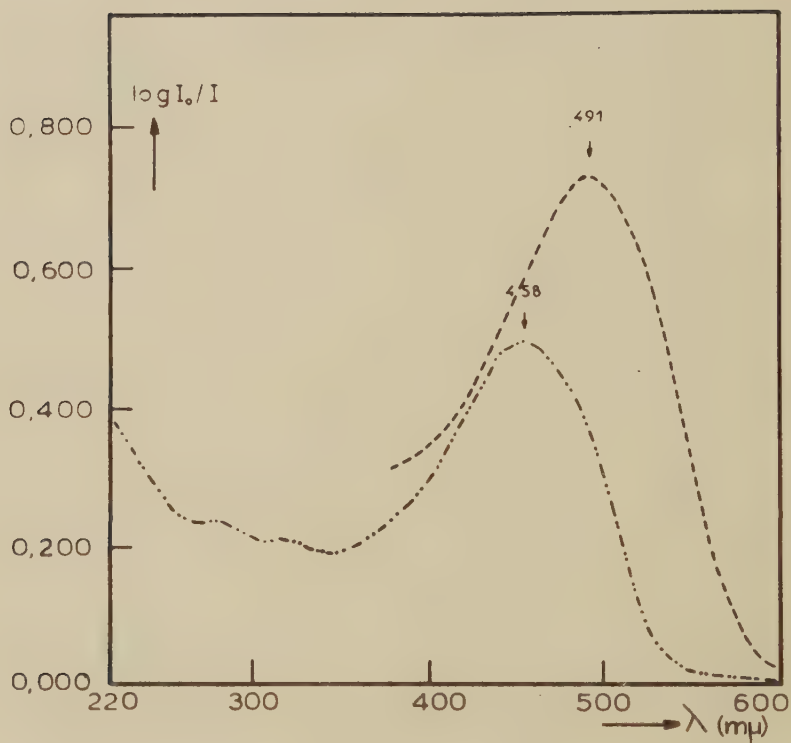


Fig. 14. Absorptiespectra van kleurstof H.P.4 in petroleumaether (40°-60°) (---) en in CS_2 (-.-) (zie § 2.4.10.).

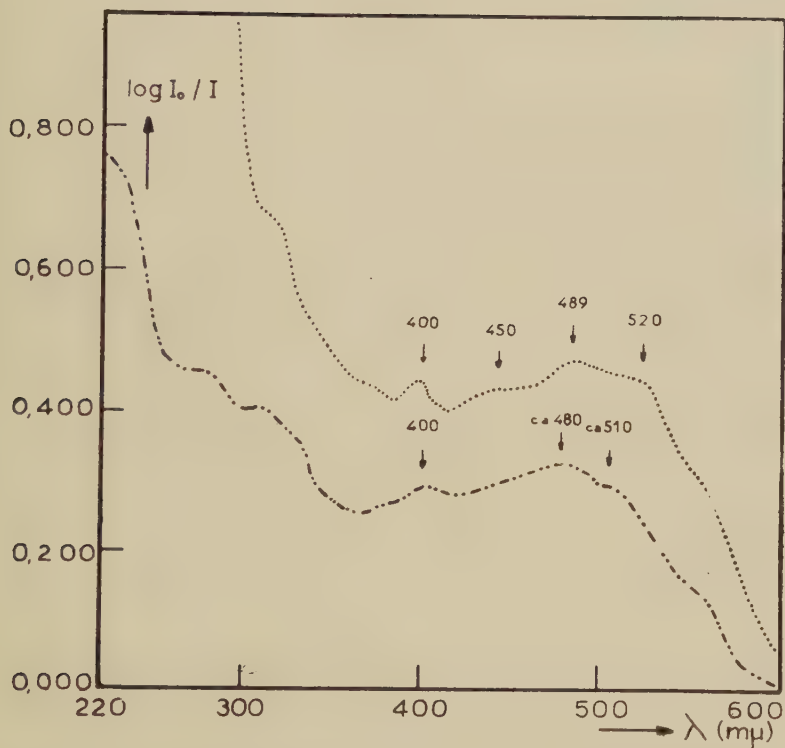


Fig. 15. Absorptiespectra van de kleurstoffen H. P. 1 (...) en H. P. 3 (-.-) in petroleumaether (40°-60°) (zie § 2.4.11.).

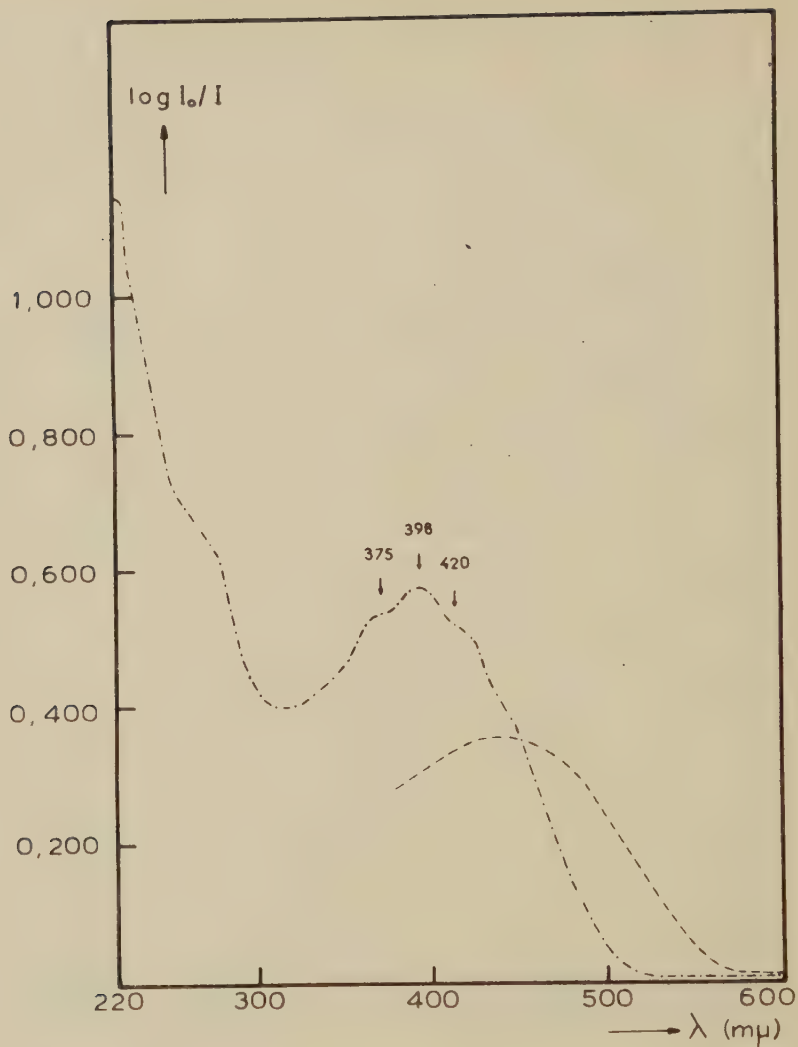


Fig. 16. Absorptiespectra van kleurstof H. P. 2 in petroleumaether (40°-60°) (---) en in CS_2 (---) (zie § 2.4.11.).

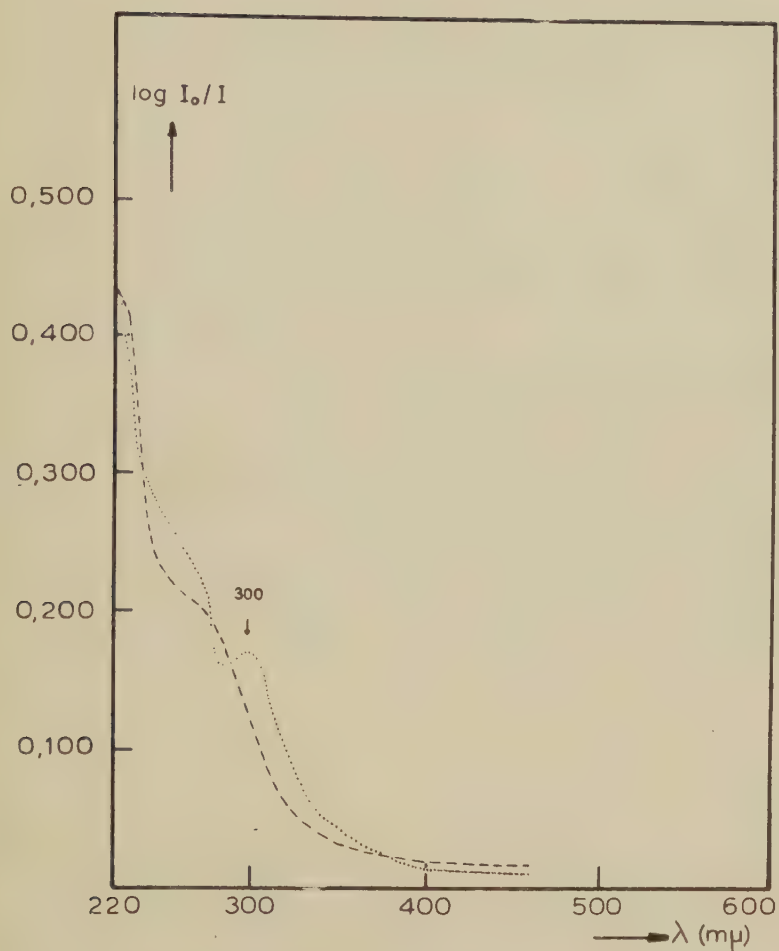


Fig. 17. Absorptiespectra van de fluorescerende componenten X (--) en Y (...) in methanol (zie § 2.5.).

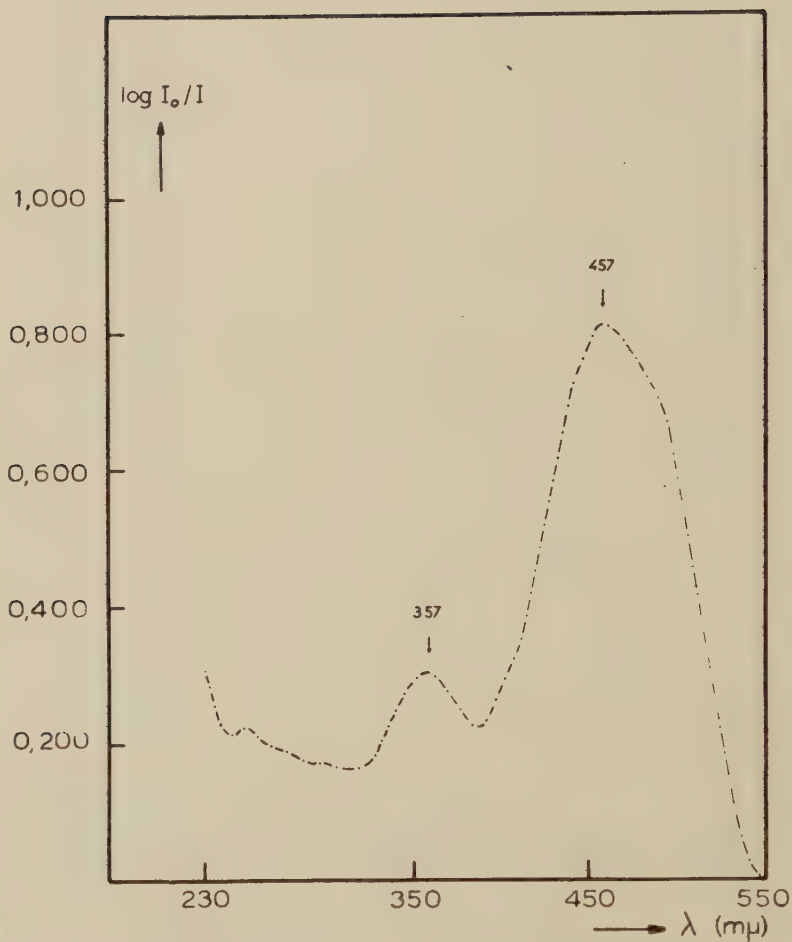


Fig. 18. Absorptiespectrum van Haxo's kleurstof V (uit *Cantharellus Cinnabarinus*) in petroleumäther (40°-60°) (zie § 2.6.1.).

Hoofdstuk VI

DE STEROÏDEN VAN POLYTOMA UVELLA ¹⁾

1. Inleiding

Bij de isolering van de carotenoiden uit *Polytoma uvella* (Strain I) werd door ons beschreven, hoe een relatief grotere steroidenfractie met een U. V. -absorptiespectrum, gelijkend op dat der bekende provitaminen D, als bijproduct gewonnen werd (hoofdstuk V).

De steroiden der phytoflagellaten, waartoe *Polytoma uvella* behoort, zijn, voor zover ons bekend is, nog niet onderzocht evenmin als die der andere protozoa.

Hier bestaat een tegenstelling met de steroiden van andere protisten, zoals de lagere fungi (gisten) en in veel mindere mate de bacteriën (1). Het voornaamste steroid van de gisten en schimmels schijnt ergosterol (provitamine D₂) te zijn. Wij herinneren er verder aan, dat alle tot dusver geïsoleerde provitaminen D, behalve ergosterol, buiten het rijk der protisten gevonden zijn (2, 4). Het leek ons daarom interessant na te gaan, of *Polytoma uvella* ook ergosterol of een ander provitamine D bevat.

2. Materiaal en methoden:

De absorptiespectra werden opgenomen met Beckmann spectrophotometers, nl. model D. U. voor het U. V. en model I. R. 2 ("single beam") voor het infrarood.

Voor de bereiding van het ruwe steroidenmengsel verwijzen wij naar de inleiding van dit hoofdstuk en naar hoofdstuk V. Voor de zuivering van de petroleumaether (40°-60°C) verwijzen we eveneens naar hoofdstuk V.

Het phenylcellosolve werd bereid uit Na-phenolaat en aethyleenchloorhydrine (12) en in vacuo gedestilleerd.

De papierchromatographische methode van Neher en Wettstein (11) werd hier en daar iets gewijzigd:

- a. Behalve bij 23°C (N. en W.) werd ook bij andere temperaturen (3°C en -8°C) gewerkt.

1) De niet met digitonine praecipiteerbare steroiden (~5%) vallen buiten dit onderzoek.

- b. Wij gebruikten hoofdzakelijk Whatman no. 1 papier en soms no. 7.
- c. De stroken werden voor het impregneren met phenycello-solve gedroogd bij 85°C gedurende 2 uur, een maatregel, die N. en W. waarschijnlijk ook namen.
- d. Daar wij niet op korte termijn over een boekenpers beschikken konden, werden de geïmpregneerde chromatografiestroken tussen 2 x 12 stroken zacht filtreerpapier éénmaal door een (metaal-) wals gehaald, waarvan de rollen op 1 mm van elkaar afgesteld waren. Er werd streng op gelet, dat de rollen over de hele breedte even ver van elkaar verwijderd waren. De snelheid van doorvoeren was ~2,5 cm/sec. De geïmpregneerde stroken (Whatman no. 1) bleken nog slechts ~11% van hun gewicht aan vloeistof te bevatten (Whatman no. 7: ~10,5%).
- e. In plaats van heptaan (kp. 98°C) gebruikten wij petroleum-aether (80-100°C).
- f. Er werd een $\frac{1}{2}$ % oplossing van de steroïden in droge, zuivere trichlooraethyleen (met water gewassen, gedroogd en gedestilleerd) op het papier gebracht.

3. Experimentele gegevens:

3. 1. Isolering van de steroïden

Voor de bereiding van het digitoniden-neerslag der steroïden van *Polytoma uvella* verwijzen wij naar hoofdstuk V.

De digitoniden werden natweemaal wassen met 90% aethanol en éénmaal met aceton (ter zuivering en ontkleuring) gedroogd in een exsiccator met silicagel en vervolgens opgenomen in zo weinig mogelijk droge pyridine (~10 ml pyridine per 50 mg digitonide). Na toevoeging van een tien maal groter volume droge peroxyde-vrije aether werd het mengsel gedurende 18 uur in een stikstofatmosfeer bewaard. Het neergeslagen digitonine werd afgecentrifugeerd en met aether gewassen.

Gewoonlijk destilleert men hierna de aether en de pyridine in vacuo af, waarbij echter dikwijls ontleding van de steroïden optreedt. Wij wijzigden de methode daarom op dit punt door de verzamelde oplossingen in aether achtereenvolgens eenmaal met $1\frac{1}{2}$ % H_2SO_4 in water en driemaal met gedestilleerd water te wassen. Na afdestilleren van de aether in vacuo bij kamertemperatuur bleef een zwak rose gekleurde inhomogene steroïdenfractie achter. Na enige dagen drogen boven silicagel in een stikstofatmosfeer was het smelttraject 120 à 140°C. Wij vermeldten reeds, dat bij de digitonidenvorming in 90% alcohol 5 à 10% van de steroïden met een U. V. spectrum, gelijk aan dat der provitaminen D, niet praecipiteerbaar was (20).

De vrijwel totale praecipitatie van het provitamine D-achtig steroïd met digitonine in alcohol wijst op de mogelijke aanwe-

zigheid van een 3- β -hydroxy-steroidstructuur. Echter ook sommige 17- α -hydroxysteroiden en enkele 3-keto-steroiden geven onder deze omstandigheden een onoplosbaar additieverbinding.(5, 21).

3. 2. U. V. -spectra

Bij vroegere experimenten met serie 4, waarbij zonder de voorafgaande praecipitatie der steroiden met digitonine in alcohol de gebruikelijke epiphase-hypophase-scheiding (petroleum-aether 40-60°C en 90% methanol) op de onverzeepbare lipoidfractie werd toegepast (vlg. 20), namen wij het volgende waar.

Bij gedeeltelijk indampen van de epiphase bij kamertemperatuur kwam een geelwitte vaste stof uit de oplossing: fractie XIII. Bij hieropvolgend afkoelen tot -60°C (koolzuur-acetonmengsel) zette zich uit de epiphase nog een geelwitte vaste stof af (smp. 128-133°): fractie XV.

Na afcentrifugeren van fractie XV in een met vast CO₂ gekoelde centrifuge werd de rest van de epiphase gechromatographeerd op kolommen van Ca₃(PO₄)₂ en Al₂O₃ (resp. MgCO₃), teneinde de carotenoiden te fractioneren. Bij het oplossen van de verkregen gekleurde fracties in alcohol bleef bij verscheidene fracties een kleinere of grotere hoeveelheid witte vaste stof achter, die pas in zeer veel alcohol oploste.

Het U. V. absorptiespectrum van één dier fracties (no. 36) wordt weergegeven in fig. 1 naast die van fractie XIII, van fractie XV en van ergosterol. In tabel I zijn de maxima weergegeven.

Tabel I

Fractie	Absorptiemaxima in m μ			
XIII	256	265	273,5	282
XV	(262)	271	281,5	293
36	262	270,5	281	292,5
ergosterol	263	271	281	293

Uit het minimum bij 240 m μ (fig. 1) en het afwijkend spectrum van fractie XIII blijkt, dat naast het provitamine D-achtige steroid nog andere kleurloze stoffen (vermoedelijk steroiden) voorkomen. Dit volgde ook uit de verderop vermelde zuiverheidsbepaling in de via de digitoniden van carotenoiden bevrijde steroiden.

Bij de isolering van het provitamine D-achtige steroid via het digitonide, zoals we die later toepasten, kregen we steeds onafhankelijk van de zuiverheid absorptiespectra met maxima, die bij dezelfde golflengten lagen als die van fractie XV, frac-

tie 36 en ergosterol. Het lipoid (steroid?), dat verantwoordelijk is voor het spectrum van fractie XIII, hebben we niet nader geïdentificeerd.

Vergeleken met het absorptiespectrum van de bekende provitaminen D zijn de maxima van fractie XIII achtereenvolgens 6, 5, 8 en 10 m μ verschoven naar kortere golflengten (fig. 1 en tabel 1), terwijl het spectrum als geheel vlakker is. Wanneer we fractie XIII buiten beschouwing laten, kunnen we concluderen, dat het U. V. absorptiespectrum van het door ons gevonden steroid, vooral wat de ligging der maxima betreft, gelijk is aan dat van steroiden met een Δ^{5-7} diëngroepering in ring B van het cyclopentanoperhydrophenanthreen-skelet, zoals b. v. ergosterol en 7-dehydrocholesterol.

De vorm der absorptiecurven was niet steeds geheel gelijk; men vergelijke in fig. 1 van de spectra 1) het kleine maximum (soms alleen een buigpunt) bij 262 m μ , b) het minimum bij $\sim$ 240 m μ en c) de verhouding der toppen bij 271, 281 en 293 m μ .

Voor deze kleine onderlinge afwijkingen kunnen we waarschijnlijk de zeker bij onze praeparaten aanwezige verontreinigingen verantwoordelijk stellen. In dit verband mogen we b. v. verwijzen naar de kleine verschillen in de U. V. absorptiespectra, zoals Hogness, Sidwell en Zscheile (6) en Huber, Ewing en Kriger (7) die voor "zuiver" ergosterol opgeven. Huber en zijn medewerkers, die een buigpunt bij 262 m μ vonden, waar Hogness en medewerkers een maximum (262 m μ) en een minimum (263 m μ) aangaven, schrijven dit eveneens toe aan onzuiverheden.

3. 3. Bepaling van het gehalte aan provitamine D-achtig steroid

Tabel 2

Enkele quantitatieve gegevens over de steroiden in de series 1, 2a en 2b.

serie 1)	volume afgecentrifugeerde organismen	drooggewicht van de organismen 2)	gewicht steroidenmengsel 3)	zuiverheid 4)	
				ongecorr.	gecorr.
1	100 ml	14 g	0,068 g	47%	42%
2a	80 ml	9,5 g	0,027 g	61%	54%
2b	55 ml	7,5 g	0,178 g	20%	17%

1) Vgl. voor de samenstelling van de series tabel 1 van hoofdstuk V.

2) Vgl. voor de bepaling van het drooggewicht hoofdstuk V.

3) Dit gewicht werd bepaald na het vrijmaken van de steroiden uit de digitoniden.

4) Zie tekst. De correctie werd weer aangebracht door $E_{282 \text{ m}\mu} - \frac{1}{2} (E_{240 \text{ m}\mu} + E_{320 \text{ m}\mu})$ in plaats van $E_{282 \text{ m}\mu}$ te nemen voor de spectrophotometrische bepaling. Vlg. hoofdstuk V, § 2. 2. 2. c).

De "zuiverheid", d.w.z. het gehalte aan provitamine D-achtig steroid, werd van de met digitonine neergeslagen steroiden voor de series 1, 2a en 2b nagegaan. Wij maakten hierbij gebruik van de feiten, dat de bekende provitaminen D dezelfde moleculaire extinctiecoëfficiënt hebben (8) en dat hun moleculairgewichten slechts enkele procenten verschillen. Nemen we aan, dat

$$E_{1 \text{ cm}}^{1\% \text{ Polyoma provit. D}}(282 \text{ m}\mu) =$$

$$E_{1 \text{ cm}}^{1\% \text{ ergosterol}}(282 \text{ m}\mu) = 302 \text{ (9).}$$

dan maken we waarschijnlijk hier slechts een kleine fout.

3. 4. Papierchromatografisch onderzoek

Waar we slechts over kleine hoeveelheden steroidenmengsel beschikten, die bovendien slechts kleine percentages (20-50%) van de provitamine D-achtige stof bevatten (tabel 2), zodat omkristalliseren (uit aceton (3) isopropanol (4) of aethylacetat (18)) tot een zuiver product met grote verliezen gepaard zou gaan, gingen we eerst het chromatografische gedrag van het onzuivere provitamine D-achtig steroid na. De keuze viel op de verdelingschromatographie van Neher en Wettstein voor steroiden met een gering aantal hydrophiele groepen (cholesterol, ergosterol, enz.) (11). Hierbij is papier (Whatman no. 7 of 1) drager, phenylcellosolve de immobiele en heptaande mobiele phase.

Voor een goed en beknopt overzicht der andere papierchromatografische methoden voor steroiden tot 1952 verwijzen we naar dezelfde auteurs (11).

Na vergelijking van enkele kleurreacties op steroiden op een papieren drager (met J_2 (13), $Br_2 + KJ$ (14), dinitrobenzeen in alcohol (15), $SbCl_5$ (14) in $CHCl_3$, of $SbCl_3$ in $CHCl_3$ (10) (= reagens van Carr en Price)) bleek, dat de beste resultaten met het laatstgenoemde reagens verkregen worden.

Behalve voor ergosterol, cholesterol en stigmasterol, die Neher en Wettstein (10, 11) hiermede aantoonde, bleek het reagens van Carr en Price ook goed te gebruiken te zijn voor 7-dehydrocholesterol en sitosterol. Aan een aanwezig handelspraeparaat van het reagens van Carr en Price voegden we 5% ajijszuuranhydride (ter stabilisatie aan de lucht) toe.

(De kleurreactie berust eigenlijk op complexvorming van het steroid met het aanwezige $SbCl_5$ (16)).

Bij vergelijking van 7-dehydrocholesterol en ergosterol naast elkaar en als mengsel op dezelfde papierstrook aangebracht (Neher en Wettstein onderzochten van de provitaminen alleen ergosterol) bleek ons, dat deze stoffen vrijwel even snel bewogen bij een afgelegde weg van ~ 15 cm (in ~ 16 uur) en 23°C . Wel kregen wij de indruk, dat 7-dehydrocholesterol gemiddeld iets sneller liep, maar een scheiding bereikten wij niet. Als de mobiele fase uit petroleumaether ($80-100^{\circ}\text{C}$) + 10% benzeen bestond, liep daarentegen het ergosterol iets sneller (Neher en Wettstein gebruikten deze laatste combinatie niet).

Ons onbekende (en onzuivere) provitamine D-achtig steroid naast en gemengd met 7-dehydrocholesterol of ergosterol liep steeds even snel als 7-dehydrocholesterol. De zo verkregen gegevens duiden (weer) op een nauwe verwantschap met de bekende provitaminen, 7-dehydrocholesterol en ergosterol, maar gaven geen uitsluitsel over het al of niet identiek zijn met één van beide der onderzochte en bekende provitaminen. Wij besloten daarom na te gaan, of een andere temperatuur (Neher en Wettstein werkten uitsluitend bij 23°C) een groter verschil in de verdelingsevenwichten der onderzochte steroïden zou geven. Bij -8°C waren de afgelegde wegen ongeveer de helft van die bij 23°C in dezelfde tijd. Het onbekende mengsel en 7-dehydrocholesterol liepen weer even snel, terwijl het ergosterol nu een afwijkend gedrag ging vertonen. Er ontstond wel weer een ergosterol-vlek na ontwikkelen en kleuren der strook, maar bovendien bleek het ergosterol een lang vaag (paars-rood) spoor achtergelaten te hebben, dat vaak tot aan de oorsprong reikte. Ook een ruw mengsel van steroïden uit de gist (de hoofdcomponent is hier ergosterol) vertoonde dit verschijnsel alleen bij -8°C . Een verklaring zou kunnen zijn, dat het ergosterol in tegenstelling met het onbekende provitamine D-achtige steroid en het 7-dehydrocholesterol een moeilijk in petroleumaether ($80-100^{\circ}$) oplosbare additieverbinding in en met het phenylcellosolve vormt. Daardoor zou het verdelingsevenwicht zich niet snel genoeg kunnen instellen voor het verkrijgen van een ophoping aan steroid op een betrekkelijk klein gebied op enige afstand van de oorsprong.

Het zou interessant zijn deze experimenten bij nog lagere temperatuur te herhalen om na te gaan, of zo misschien wel een volledige scheiding tussen ergosterol, 7-dehydrocholesterol en eventueel de andere provitaminen te bewerkstelligen is. In verband met onze nog niet geslaagde scheidingspogingen wijzen wij er op, dat Kritchevski en Kirk (19), die ergosterol en 7-dehydrocholesterol vergeleken met hun "reserved phase" chromatographie, wel een verschil in R_F vonden (resp. 0,84 en 0,88), maar ook nog niet in een echte scheiding slaagden.

Uit het gedrag van ergosterol bij -8°C menen wij te mogen concluderen, dat het provitamine D-achtige steroid uit Polytona uvella waarschijnlijk géén ergosterol is.

Een feit, dat nog opviel, was, dat wij met onze kleuring slechts één component op het papier ontdekten, behoudens een kleine achtergebleven vlak in de oorsprong. Waarschijnlijk hebben wij dus behalve het (de) provitamine D-achtige steroid (en) geen verdere 5-onverzadigde steroiden in ons onbekende mengsel. McMahon, Davis en Kalnitzky scheidden ergosterol ($R_F = 0$) (?) en 7-dehydrocholesterol $R_F = 100$) (?) met opstijgende papierchromatografie op Whatman no. 1 papier en een mengsel van phenol, methanol en water (13,5 : 30 : 56,5) als mobiele fase (14).

Wij trachten dit na te doen bij 30° en 23°C (McMahon e.m. gaven geen temperatuur op) met dezelfde mobiele fase en met iets gewijzigde mengsels (14 : 30 : 56) en (14,5 : 30 : 55,5). Beide steroiden bleven bij ons achter in de oorsprong. Het verschil zou kunnen liggen aan een verschillend gehalte aan kristalwater of kristalvloeistof in het algemeen. McMahon e.m. vermeldde niet, in welk oplosmiddel zij de steroiden daartoe op de papierstrook brachten; wij losten de steroiden op in zuivere trichlooraethyleen.

3. 5. Verdere experimentele gegevens

Het infrarood absorptiespectrum van het onzuivere provitamine D-achtige steroid werd vergeleken met dat van zuiver ergosterol en zuiver 7-dehydrocholesterol tussen 8 en 12 μ ("vingerafdrukgebied"). De spectra van de oplossingen van de genoemde stoffen (1 à 2% in CS_2) werden in een steenzoutcel (1 mm) gemeten.

De karakteristieke absorptie (10,28 - 10,31 μ) van steroiden met een trans dubbele binding in de zijketen op de 22-plaats kregen wij zowel bij het ergosterol als bij het steroidenmengsel uit de Polytoma's (Literatuur 20, 22).

Er zijn nu twee mogelijkheden:

1. Het absorptiemaximum bij 10,28 - 10,31 μ van het steroidenmengsel uit de Polytoma's behoort bij het provitamine D-achtige steroid;
2. Het absorptiemaximum bij 10,28 - 10,31 μ behoort tot een ander in het mengsel aanwezig steroid.

De eerste mogelijkheid lijkt ons het waarschijnlijkst door de grote gelijkenis tussen de spectra van ergosterol en het mengsel uit de Polytoma's, vooral in het gebied 8,80 - 10,60 μ . Uit deze gelijkenis kan men een waarschijnlijk nauwere verwantschap van het provitamine D- uit Polytoma uvella met ergosterol dan met 7-dehydrocholesterol afleiden.

Provitamine D-achtige steroiden werden in de lipoiden van Polytoma uvella gevonden, ongeacht de stikstofbron (asparagine, ammoniumacetaat, glycine of gistwater).

Ook de bekende kleurreacties van Liebermann-Burchardt (steroid + azijnzuuranhydride + H_2SO_4 in $CHCl_3$ geeft een

kleur) en Rosenheim-Page (steroid in b. v. trichlooraethyleen + een geconcentreerde waterige oplossing van trichloorazijnzuur geeft een kleur) waren positief. De laatste reactie duidt weer op een systeem, met geconjugeerde dubbele banden in het steroid.

Enkele oriënterende gefractioneerde kristallisaties van de steroiden van de series 1 en 2a uit aceton (3) toonden, dat fracties te verkrijgen waren met een kleiner smeltpuntstraject (variërend van 20° tot 90°C) dan het ruwe product (~20°C). Deze trajecten lagen tussen 135 en 162°C. De fracties waren te klein om er de zuiverheid spectrophotometrisch van na te gaan.

4. Samenvatting

1. Het steroidenmengsel uit *Polytoma uvella* werd spectrophotometrisch (U. V. en I. R.) en chromatographisch onderzocht. Dit onderzoek alsmede enkele chemische reacties duiden op de aanwezigheid van een steroid, dat nauw verwant is aan de bekende provitaminen D. Het heeft zeer waarschijnlijk een dubbele band in de zijketen, zoals ergosterol en 7-dehydrostigmasterol. Uit het chromatographisch onderzoek bij lage temperatuur, kwam een enkele aanwijzing, dat het steroid geen ergosterol is.
2. Uit de zuiverheidsbepalingen van het provitamine D-achtige steroid, uit het feit, dat éénmaal een steroidfractie met een afwijkend U. V. absorptiespectrum (fractie XIII) geïsoleerd werd en uit de smeltpuntsbepalingen bleek, dat nog andere lipoiden (steroiden) aanwezig waren.

Deze andere steroiden hadden in het algemeen geen karakteristiek U. V. absorptiespectrum en waren waarschijnlijk geen Δ^5 -onverzadigde steroiden (geen Carr en Price reactie).

5. Literatuur

1. Greaves, J. ; J. Bact. 30, 143 (1935).
2. Sifferd, R. H. en Anderson, R. S. ; J. Parasit. 26, 21 (1940).
Rosenberg, H. R. ; Chemistry and Physiology of the Vitamins, Interscience Publ. Inc. New York (1945).
3. Lamb, E. W., Mueller, A. en Beech, G. W. ; Ind. Eng. Chem. Anal. ed. 18, 187 (1946).
4. Rosenberg, H. R. en Waddell, J. ; J. Biol. Chem. 191, 757 (1951).
Petering, H. S. en Waddell, J. ; J. Biol. Chem. 191, 765 (1951).
5. Strain, W. H. ; Hoofdstuk 17 in Gilman, H. (red.) Organic Chemistry II. John Wiley and Sons Inc. New York (1942).

6. Hogness, T. R. , Sidwell, A. E. Jr. en Zscheile, F. P. Jr.
J. Biol. Chem. 120, 239 (1937).
7. Huber, W. , Ewing, G. W. en Kriger, J.; Am. Chem. Soc.
67, 609 (1945).
8. Loofbourov, J. R. ; Vitamines and Hormones 1, 134
(1943).
9. Keverling Buisman, J. A. ; persoonlijke mededeling (1953).
10. Neher, R. en Wettstein, A.; Helv. Chim. Acta 34, 2278
(1951).
11. Neher, R. en Wettstein, A.; Helv. Chim. Acta 35, 276 (1952).
12. Bentley, W. H. , Haworth; E. en Perkin, W. H.; J. Chem. Soc.
69, 164 (1896).
13. Bush, J. E. ; Biochem. J. 50, 372 (1952).
14. McMahon, J. M. , Davis, R. B. en Kalnitzky, G.; Proc. Soc.
exptl. Biol. Med. 75, 799 (1950).
15. Kritchevski, T. H. en Tiselius, A.; Science 114, 299 (1951).
16. Brüggeman, J. , Kraus, W. en Tiewes, J.; Ber. 85, 315
(1952).
17. Barton, D. H. R. en Bruun, T.; J. Chem. Soc. 27, 28 (1951).
18. Usdin, V. R. en Burrell, R. C.; Archiv. Biochem. Biophys.
36, 172 (1952).
19. Kritchevski, D. en Kirk, M. R.; J. Am. Chem. Soc. 74, 4484
(1952).
20. Turnbull, H. J. , Whiffen, D. H. en Wilson, W.; Chem. and Ind.
33, 626 (1950).
21. Haslewood, G. A. D. ; Biochem. J. 41, 639 (1947).
22. Norman Jones, R. ; J. Am. Chem. Soc. 72, 5322 (1950).

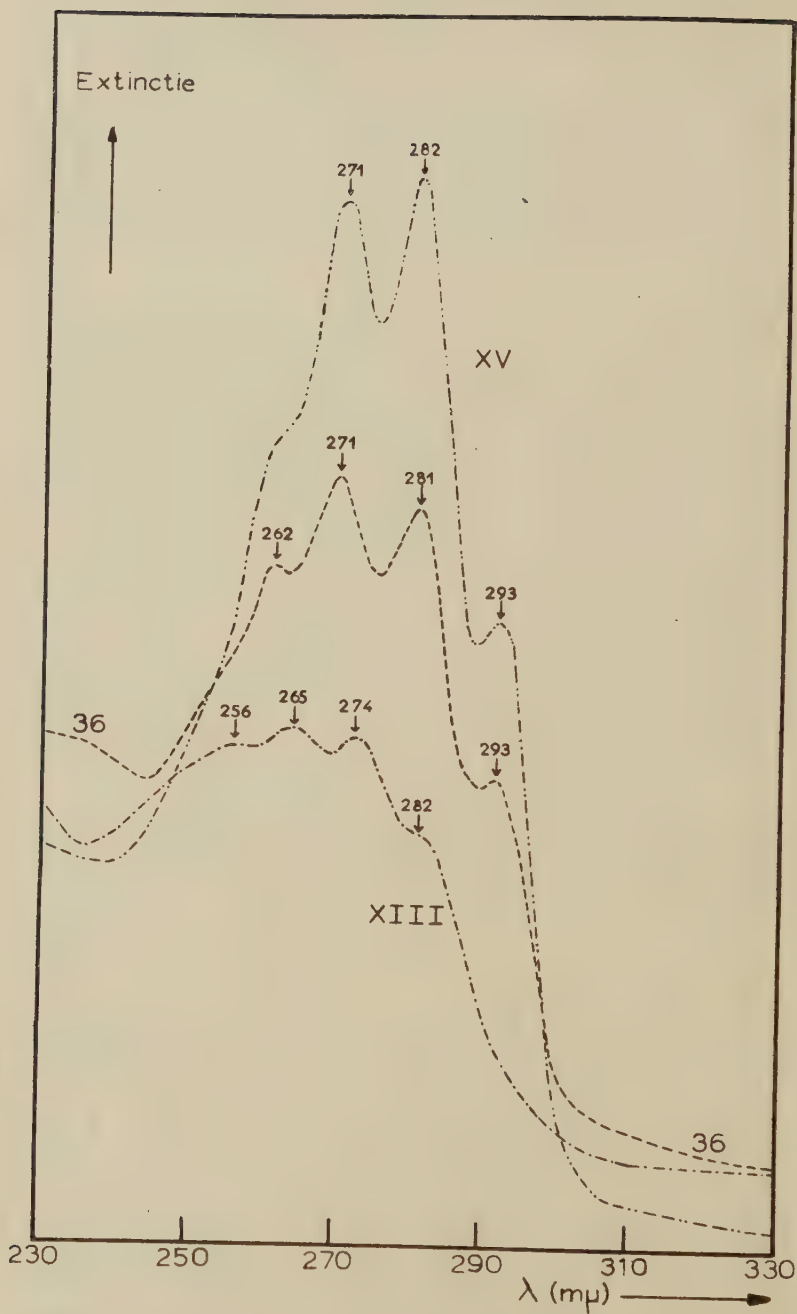


Fig. 1. Ultraviolet absorptiespectra van fractie XIII, fractie XV en fractie 36 in petroleumaether (40°-60°) (zie §, 3.2.).

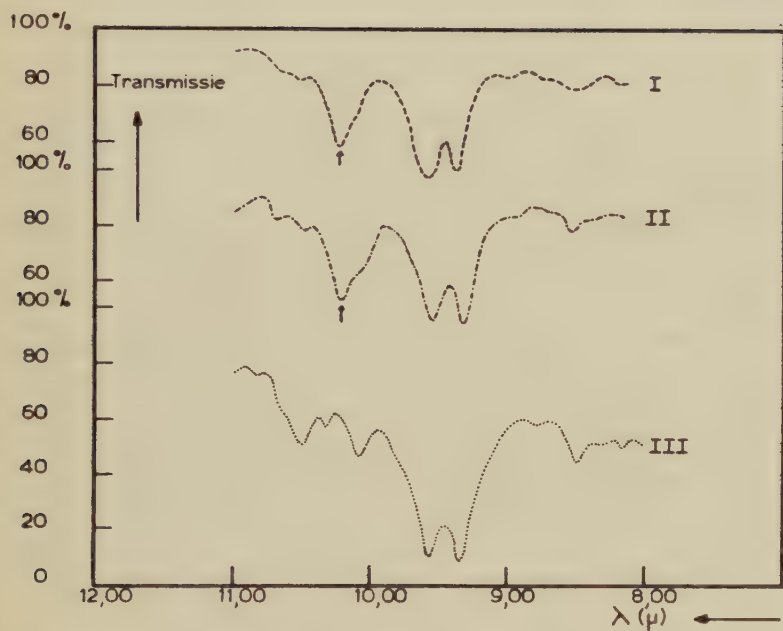


Fig. 2. Infrarood absorptiespectra van Polytomasterol (I), ergosterol (II) en 7-dehydrocholesterol (III) in CS_2 (zie § 3.5.).

Hoofdstuk VII

DE HOGERE VETZUREN VAN POLYTOMA UVELLA

1. Inleiding

Voor zover ons bekend is, zijn de vetzuren van de phytoflagellaten en van decandere protozoa evenmin als de steroiden van deze organismen, niet eerder onderzocht. De kennis van de samenstelling van de vetzuren (en de steroiden) zou naast die van de carotenoiden aanwijzingen kunnen verschaffen over phylogenetische verwantschappen van de phytoflagellaten (Hoofdstuk V). Over bijv. de, met de phytoflagellaten nauw verwante, hogere algen (vergelijk de voetnoot bij hoofdstuk V, § 1), zijn we, wat dit betreft, iets beter ingelicht (1, 2). Hier bleek de samenstelling van de vetzuren min of meer specifiek te zijn voor de onderzochte klasse van algen.

Bij ons onderzoek van de carotenoiden uit de phytoflagellaat *Polytoma uvella* werden een steroid- en een vetzuurfractie als bijproducten verkregen (Hoofdstuk V). Met het onderzoek van de steroidfractie werd een begin gemaakt (Hoofdstuk VI). Het leek ons interessant, ook de vetzuurfractie te onderwerpen aan een onderzoek, waarvan hieronder de resultaten volgen.

2. Methoden

Teneinde ook met de geringe, ons ter beschikking staande, hoeveelheden vetzuur uit *Polytoma uvella* zo nauwkeurig mogelijk gegevens te verzamelen, bepaalden we ons voorlopig tot:

- a) de kwantitatieve spectrophotometrische bepaling van de niet-geconjugeerde di- en polyeenzuren.
- b) de kwantitatieve bepaling van monoëenzuur („oliezuur”) met behulp van de uitkomst van a) en het joodadditie (J.A.)-getal.
- c) de gravimetrische bepaling van de gezamenlijke verzadigde vetzuren na de oxydatieve afbraak van de onverzadigde vetzuren.
- d) de bepaling van het gemiddelde moleculair gewicht van alle vetzuren (zie tabel 1, kolom „zuiverheid”).

Ad a) Voor de spectrophotometrische bepaling werd gebruik ge-

maakt van een voorschrift van de American Oil Chemist's Society (A. O. C. S.) (5, 6) *).

- Ad b) Voor de bepaling van het J.A. -getal werd de standaard methode van Wijs gevolgd (17).
- Ad c) Voor de gravimetrische bepaling van het totale % verzadigde vetzuren werd gebruik gemaakt van de methode van Schuette en Nogare (3). Hierbij wordt een bekende hoeveelheid ($\pm 1/4$ g) vetzuren als methylester behandeld met KMnO_4 , waarbij alleen de onverzadigde componenten geoxydeerd worden. Na een chloroform-extractie wordt een chromatografische scheiding verricht op een door broomthymolblauw gekleurde Al_2O_3 -zuil. De oxydatieproducten blijven in de zuil geadsorbeerd (en kleuren deze ter plaatse rood), terwijl de methylesters van de verzadigde vetzuren met (meer) chloroform geëluëerd worden.

3. Experimentele bijzonderheden en resultaten 1)

Tabel 1

Hoeveelheden van de vetzuren in de series 1 en 2b.

Serie 1)	Totale hoeveelheid vetzuren in g	g/100 ml organismen 2)	g/100 drooggewicht 3)	zuiverheid 4)
1	1,50	1,50	10.7	99,5%
2b	0,75	1,38	10.0	99,5%

*) Dit voorschrift is gebaseerd op een door Mitchell, Kraybill en Zscheile in 1943 ingevoerde methode, waarbij door isomerisatie in alkalisch milieu de ongeconjugeerde dubbele banden voor het grootste gedeelte in geconjugeerde systemen worden overgevoerd. De extincties der met de verschillende conjugatietypen corresponderende absorptiemaxima in het U. V. worden gemeten, waarna uit deze waarden met een aantal lineaire vergelijkingen en experimenteel bepaalde constanten de gehalten van de diverse zuren worden berekend.

In 1945 verbeterden Brice en Swain de methode door ook rekening te houden met de oorspronkelijk reeds aanwezige geconjugeerde vetzuren en de achtergrondabsorptie (7). Het A.O.C.S.-voorschrift van 1949 maakte bij de berekening nog gebruik van constanten, die verkregen waren met, via het polybromide gezuiverd, linol-, linoleen- en arachidonzuur (5). Zó gezuiverde zuren bevatten echter ook de "onnatuurlijke" trans-isomeren (10, 11) en hebben daarom een iets andere (gemiddelde) isomerisatiegraad dan de natuurlijke geheel cis-verbindingen (12, 13, 14). Het A.O.C.S.-voorschrift van 1951 vermijdt deze fout door de constanten te baseren op door chromatografie (op een kiezelzuurzuil) gezuiverde (15) natuurlijke geheel cis-verbindingen (6).

- 1) Voor de samenstelling van de media enz. vergelijk men hoofdstuk V.
- 2) $\text{g}/100 \text{ ml} = \text{g}/100 \text{ g}$ „nat gewicht“.
- 3) Het drooggewicht werd na extractie der lipoiden voor de series 1 en 2b bepaald op, respectievelijk 14,0 en 7,5 g.
- 4) De „zuiverheid“ werd bepaald door 50 mg met 0,1 N natriumaethanolaat in alcohol te titreren; voor de berekening werd het moleculair gewicht van oliezuur aangenomen als zijnde het gemiddelde moleculair gewicht van het vetzuurmengsel.

3. 1. Bepaling van de diënzuren en de polyënzuren

3. 1. 1. Voor de bepaling van de (reeds vóór de isomerisatie aanwezige) geconjugeerde vetzuren werd 5 à 7 mg vetzuurmengsel tot op 0,01 mg nauwkeurig afgewogen en opgelost in 25 ml benzeenvrije n-hexaan. Van deze oplossing werd het U. V. absorptiespectrum gemeten (fig. 1a). (Voor de zuivering van het n-hexaan vergelijk men hoofdstuk V).

3. 1. 2. Voor de bepaling van de meervoudig onverzadigde, niet geconjugeerde vetzuren werd 50 à 100 mg vetzuurmengsel in 10 ml van een 6,5% KOH-oplossing in glycol bij 180°C in een stikstofatmosfeer gedurende 25 minuten geïsomeriseerd (Voor de beschrijving van de glycolzuivering verwijzen we naar de literatuur (8, 16)). Van het geïsomeriseerde vetzuurmengsel werd het U. V. -absorptiespectrum in absolute aethanol gemeten (fig 1b). De bepalingen werden in duplo uitgevoerd. De gemiddelde fout bedroeg 2,5%. Voor de resultaten verwijzen we naar tabel 2.

3. 2. Bepaling van het mino-eenzuur („oliezuur“)

Circa 50 mg vetzuurmengsel werd in 0.1 N oplossing van Wijs (JCl in ijsazijn) opgelost. Na enige tijd werden KJ en H₂O toegevoegd. De overmaat JCl (~ 50%) werd teruggetitreerd met 0.1 N natriumthiosulfaat.

$$\begin{aligned} &\text{Nu stelt men, dat \% oliezuur} = \\ &= \frac{\text{J.A.getal} - ((\% \text{ linolz.} + \% \text{ geconj. diënz.})1,81 + (\% \text{ linoleenz.})2,74)}{0,899} \\ &- \frac{(\% \text{ arachidonz.})3,34}{0,899} \end{aligned}$$

De constanten 0,899, 1,81, 2,74 en 3,34 zijn 1% van het joodadditie (J.A.)getal van respectievelijk oliezuur, linolzuur, linoleenzuur en arachidonzuur.

De resultaten zijn in tabel 2 vermeld.

3. 3. Bepaling van de verzadigde vetzuren

Zie voor de beschrijving onder „Methoden” en voor de resultaten tabel 2.

Tabel 2

Procentuele samenstelling van het mengsel hogere vetzuren afkomstig van *Polytoma uvella*

Serie	geconj. diëenzuur	niet-geconj. diëenzuur ²⁾	niet-geconj. triëenzuur ²⁾	niet-geconj. tetraëenzuur ²⁾	monoeenzuur ^{1) 2)}	verzadigd vetzuur
1	1.1	21.7	10.0	10.7	30.7	22.7
2b	0.5	24.8	11.6	14.3		33.0

1) Het J. A. getal was (voor serie 1): 132.

2) Deze fracties worden gewoonlijk de linolzuur-, linoleenzuur-, arachidonzuur- en oliezuurfracties genoemd.

4. Discussie

Het zwakke absorptiemaximum bij 345 m μ in fig. 1b wijst op de aanwezigheid van kleine hoeveelheden pentaënzuren. De aanwezigheid van deze zuren in vetzuurmengsels van biologische oorsprong kan in vele gevallen tot belangrijke fouten in de boven beschreven methode leiden. Wij hielden er echter bij onze berekeningen geen rekening mede. Een semi-quantitatieve berekening (vgl. 8) toonde nl. aan, dat slechts maximaal ~3% pentaënzuren in beide monsters aanwezig was. Verder bleek, dat de berekende percentages linolzuur en linoleenzuur er niet, respectievelijk zeer weinig door beïnvloed werden. Het % arachidonzuur moet met ten hoogste 3 verminderd worden.

Met de toegepaste spectrophotometrische bepaling worden niet-geconjugeerde diëen-, triëen- en tetraënzuren bepaald ongeacht het aantal C-atomen van de vetzuurmoleculen. In de fractie diëenzuur („linolzuur”) zouden zich dus ook bijv. niet-geconjugeerd hexadiëen- en eicosadiëenzuur kunnen bevinden. De titratie van het totale vetzuurmengsel (vergelijk tabel 1, kolom „zuiverheid”) toont echter aan, dat de hogere vetzuren in het onderzochte mengsel gemiddeld 18 C-atomen per molecule (zoals olie-, linol- en linoleenzuur) bezitten.

Onze uitkomsten zijn niet goed met de schaarse literatuurgegevens over de vetzuursamenstelling van de hogere algen (zie inleiding) te vergelijken. De gegevens in de literatuur werden namelijk tot dusver meestal verkregen door achter-eenvolgens

a) de verzadigde en onverzadigde vetzuren met bijv. de lood-zoutmethode te scheiden en daarna

b) de vetzuren van de beide hoofdfracties in de estervorm door destillatie verder te fractionneren. Hierbij werden de vetzuren met eenzelfde aantal C-atomen per molecuul, maar met een verschillende graad van onverzadiging in één fractie verkregen. De gemiddelde graad van onverzadiging werd bepaald door kwantitatieve hydrogenering (1, 2). Voor deze methode is vrij veel vet(-zuur) nodig.

Het is te wensen, dat in de toekomst de onverzadigde vetzuren van protozoa en algen ook met de spectrophotometrische methode onderzocht zullen worden. Deze methode wordt elders (klinisch onderzoek) reeds in toenemende mate toegepast, kan ook op micro-schaal (monster ~ 10 mg vet) uitgevoerd worden (8, 9) en verschaft gedetailleerder gegevens.

5. Samenvatting

De analyse van de hogere vetzuren van de phytoflagellaat *Polytoma uvella* werd beschreven. De onverzadigde vetzuren werden spectrophotometrisch en m.b.v. het joodadditiegetal bepaald. De verzadigde vetzuren werden gravimetrisch bepaald na ontleding van de onverzadigde vetzuren.

Resultaten: het totale vetzuurgehalte bedraagt 10-11% van het drooggewicht; de verzadigde vetzuren bedragen 23-33%, het oliezuur 33-40%, het linolzuur 22-25%, het linoleenzuur 10-12% en het arachidonzuur 11-14% van het totale vetzuurmengsel.

6. Literatuur

1. Hilditch, T. P. ; The Chemical Constitution of Natural Fats. Chapman and Hall., London (1947).
2. Boekenogen, H. A. ; De Scheikunde der Olien en Vetten, Oosthoeks' Uitg. Mij., Utrecht (1948).
3. Schnette, H. A. en ; J. Am. Oil. Chemists' Soc. 28,
Nogare, S. D. (1951).
4. Mitchell, J. H., Kraybill, ; Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 15,
H. R. en Zscheile, F. P. 1 (1943).
5. Report of the Spectroscopy; J. Am. Oil. Chemists' Soc. 26,
Committee 1949 400 (1949+)
6. Report of the Spectroscopy; J. Am. Oil. Chemists' Soc. 28,
331 (1951).
7. Brice, B. A. en Swain, M. L.; J. Opt. Soc. Am. 35, 532 (1945).
8. Verloop, A., Stol, H. J. ; Ongepubliceerd (1952).
en Havinga, E.
9. Herb, S. F. en Riemen- ;
schneider, R. W. Anal. Chem. 25, 953 (1953).

10. Matthews, Brode, W. R. ; J. Am. Chem. Soc. 63, 1064
en Brown, J. B. (1941).
11. Mowry, D. T., Brode, ; J. Biol. Chem. 142, 671 (1942).
W. R. en Brown, J. B.
12. Nichols, P. L., Riemenschneider, R. W. en Herb, ; J. Am. Oil Chemists' Soc. 27,
S. F. 329 (1950).
13. Riemenschneider, R. W., ; J. Am. Oil Chemists' Soc. 26,
Herb, S. F. en Nichols, P. L. 371 (1949).
14. Nichols, P. L., Herb, S. F. ; J. Am. Chem. Soc. 73, 247
en Riemenschneider, R. W., (1951)
15. Brice, B. A., Swain,
M. L., Herb, S. F., Nichols
P. L. en Riemenschneider, ; J. Am. Oil Chemists' Soc. 29,
R. W. 279 (1952).
16. Pestemer, M. ; Angew. Chemie, 63, 118 (1951).
17. Assoc. Official Agr. Chem. ; Official and Tentative Methods
of Analysis 6th ed. p. 495
(1945).

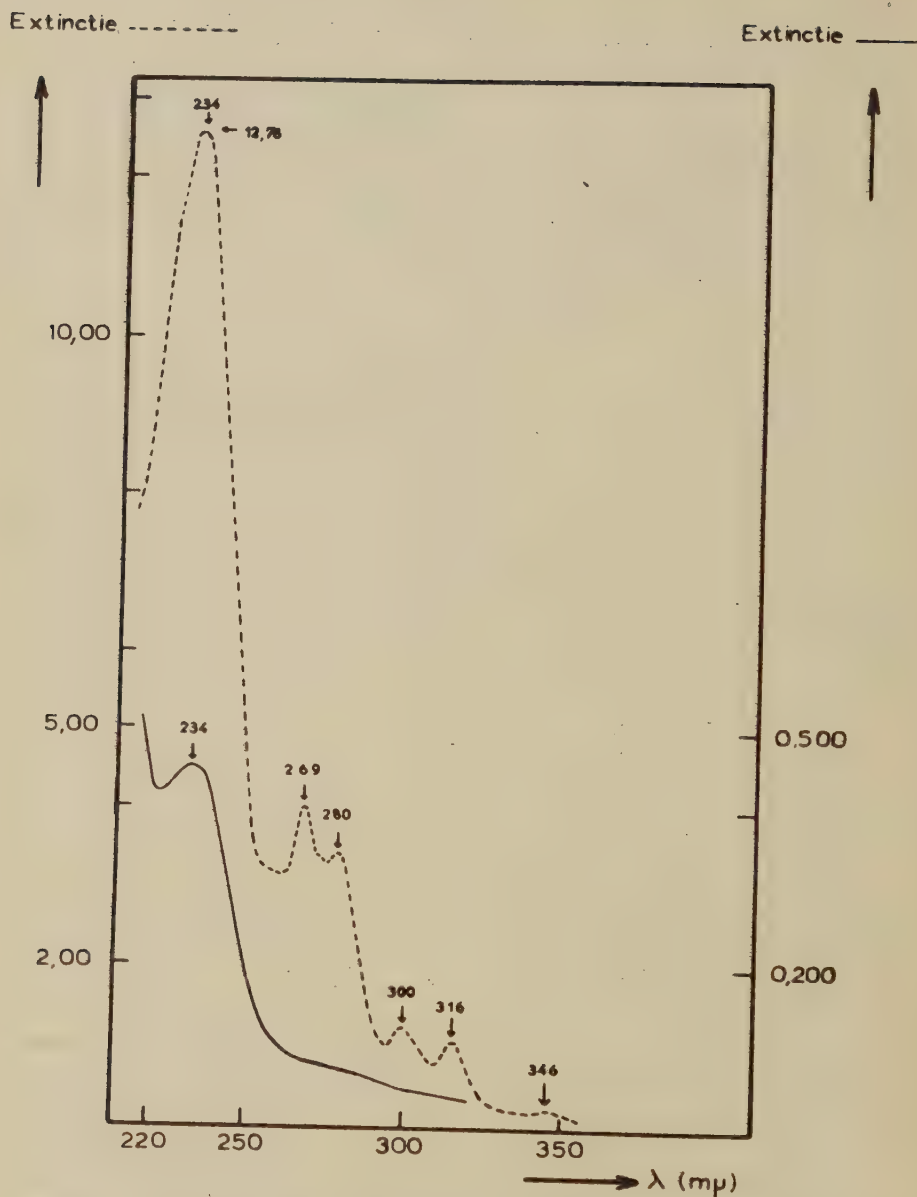


Fig. 1. Ultraviolet absorptiespectra van de vetzuren van *Polytoma uvella* in absolute aethanol voor (—; rechter extinctieschaal) en na (---; linker extinctieschaal) isomerisatie (zie § 3). De extinctie-curven voor en na isomerisatie zijn op gelijke concentratie omgerekend.

Hoofdstuk VIII

GROEIPROEVEN MET POLYTOMA UVELLA (STRAIN 1) OP SYNTHETISCHE MEDIA 1)

1. Inleiding

1. 1. De voeding van *Polytoma uvella*

Dank zij het werk van verscheidene onderzoekers weten wij, dat *Polytoma uvella* vooral azijnzuur, boterzuur, valeriaanzuur, capronzuur en in iets mindere mate isocapronzuur als koolstofbron kan gebruiken (Pringsheim (2), Provasoli (3)).

Verder voldoen ook melkzuur, barnsteenzuur en aethylacetat. Ongeschikt zijn propionzuur, isoboterzuur, isovaleriaanzuur, heptylzuur en alle tot dusver onderzochte alcoholen, aminozuren en suikers (b.v. glucose). Dat bijv. glucose niet gebruikt kan worden, komt waarschijnlijk door het ontbreken van het enzym hexokinase, hetgeen zeker het geval is bij *Polytomella coeca* (4).

Uit een oogpunt van vergelijkende physiologie is het interessant, dat bijv. *Polytoma ocellatum* (Francé) propionzuur en ook vetzuren met meer dan 6 C-atomen als koolstofbron kan gebruiken (5).

(In 1954 beschreef Pringsheim een nieuwe flagellaten-soort, nl. *Polytoma mirum*, die in tegenstelling tot de andere soorten van *Polytoma* goed op glucose en slecht op acetaat groeit (26)).

Als stikstofbron bleken ammoniumzouten, enkele aminozuren (glycine, cysteine en asparagine) en enkele amides (glucosamide) te voldoen (2). Ook chemisch minder scherp gedefinieerde N-bronnen, zoals peptonsoorten, vleesextract, gistextract enz. konden als zodanig gebruikt worden (2, 3).

Volgens de literatuur heeft *Polytoma uvella* in tegenstelling met andere *Polytoma*-soorten geen vitaminen nodig (3, 6).

Voor de voeding der phytoflagellaten in het algemeen verwijzen wij naar enkele overzichtsartikelen (7, 8, 9).

1) Deze stam werd verkregen van Prof. Dr. E.G. Pringsheim, Botany School, Univ. of Cambridge, England.

1. 2. Aanleiding en beperking van de eigen groeiproeven op synthetische media 1)

Aanvankelijk kweekten wij *Polytoma uvella*, gebruikt als proeforganisme voor onze onderzoeken over de chemotaxis, op een niet-synthetisch medium en kregen steeds goede groei; zie tabel I. In dezelfde tabel geven we de synthetische media van Pringsheim 1937 (2) en Lwoff en Dusi 1941 (10); vergelijk ook (11).

Tabel I

Pringsheim 1937		Lwoff en Dusi 1941		Door ons gebruikt medium
0,2	% NaAc	0,1	% NH_4Ac	0,2 % NaAc
0,1	% N-bron 1)			0,2 % glycine
0,01	% K_2HPO_4	0,02	% K_2HPO_4	0,02 % K_2HPO_4
0,01	% MgSO_4	0,01	% MgSO_4	0,01 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
		0,01	% KCl	0,02 % Na_2CO_3
0,00001	% FeCl_3	0,0005	% FeCl_3 2)	
		0,005	% CaCl_2 2)	
0,1	% caramel			0,2 % glucose 3)

1) Als N-bron werd asparagine, glycine, glucosamine, cysteine of NH_4 -zouten gebruikt.

2) FeCl_3 en CaCl_2 werden pas ná het steriliseren van de rest toegevoegd.

3) De glucose caramelliseert eveneens bij onze wijze van steriliseren gedurende 20 min. bij 120°C .

4) Overall was op pH 7,5 (na steriliseren) ingesteld.

Aqua dest. werd als oplosmiddel gebruikt. De kweektemperatuur was $23^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Pringsheim entte met "möglichst wenig" cellen (0,03 ml/10 ml ?!).

Lwoff entte met "een druppel" per 4 ml en wij met 0,03 ml/10 ml.

Terwijl Pringsheim concludeerde, dat caramel een noodzakelijke groeistof is bij zijn, in de tabel genoemde, N-bronnen, kon Lwoff dit niet bevestigen. Lwoff meende, dat het caramel bij Pringsheim als bron van Fe of andere metalen (Ca) gediend had, of dat dit het Fe in oplossing hield tijdens het steriliseren der media. (Voor de chemische samenstelling van

1) Onder een synthetisch medium verstaat men een voedingsbodem, die alleen chemisch goed gedefinieerde stoffen bevat.

caramel zie (25)). Lwoff kreeg nl. zelf pas groei, als hij FeCl_3 en CaCl_2 na het steriliseren toevoegde. Lwoff gebruikte als N-bron uitsluitend NH_4 -acetaat.

Toen wij overgingen tot een uitgebreider biochemisch onderzoek van *Polytoma uvella*, waarbij ook de lipoiden (carotenoiden, steroiden en vetzuren) van dit organisme betrokken werden *), bleek het ons wenselijk eveneens over te gaan tot een synthetisch medium. Weglaten van het door ons steeds toegevoegde gistwater (10 volume %) en de glucose, reduceerde de groei enorm. Het criterium hierbij was de hoeveelheid organismen, uitgedrukt in ml's per 100 ml medium, die uiteindelijk bezonken was. Extra toegevoegd caramel en (of) FeCl_3 en CaCl_2 (na het steriliseren toegevoegd) herstelden de goede groei niet. Pas toen wij glycine vervingen door asparagine, kregen wij op ons synthetisch medium uitstekende groei zonder caramel-, FeCl_3 -, of CaCl_2 -toevoeging. Ook toevallig met bacteriën geïnfecteerde cultures op het synthetische Na-acetaat-glycine medium vertoonden soms goede groei.

Waar het gebruik van het kostbare asparagine voor de massacultures, benodigd voor het lipoiden-onderzoek, ons niet verantwoord leek, besloten wij een onderzoek in te stellen naar de oorzaak van het frappante verschil tussen asparagine en glycine als N-bron in ons synthetisch medium. Er waren o.i. de volgende mogelijkheden om de vermelde beïnvloedingen van de groei te verklaren:

1. De asparagine, het gistwater, of de bacteriëninfectie brengt een groeifactor in het medium of verwijdert een remfactor (bijv. een zwaar metaalion door complexvorming).
2. De glycine bevat een remstof, of neemt een groeifactor (spore-element) uit het medium weg.
3. Asparagine maakt de gelijktijdige toevoeging van een bepaalde groeifactor in het medium (0,2% NaAc; 0,2% N-bron; 0,02% K_2HPO_4 ; 0,01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,02% Na_2CO_3) overbodig, terwijl deze factor bij gebruik van glycine als N-bron onontbeerlijk is.

Ter beperking van het onderzoek besloten wij voorlopig alleen een onderzoek in te stellen naar de invloed van spore-elementen, vitamine B_1 en vitamine B_{12} , aan welke ergonomen o.i. bij gissingen omtrent de bovengenoemde mogelijkheden het allereerst een rol zou willen toekennen.

1. 3. De concentratie van de spore-elementen

Zowel glycine, als asparagine, als de eiwitten in het gistwater kunnen met zware metaalionen complexen vormen (24). Door het verlagen van de concentratie van de metaalionen kunnen de complexvormers zowel een giftige concentratie on-

*) Hoofdstukken V, VI en VII.

schadelijk maken, als een goede concentratie zodanig verlagen, dat er deficiënties optreden. Vergelijk bijv. (9).

Er zal verschil zijn in het complexvormend vermogen van glycine, asparagine, gistewitten en andere grotendeels onbekende componenten van het gistwater. Van de aard en de hoeveelheden van de ongetwijfeld aanwezige spore-elementen in onze media is vrijwel niets bekend.

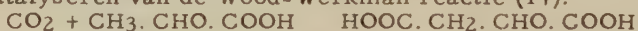
1. 4. Vitamine B₁ als mogelijke groeifactor

Alhoewel *Polytoma uvella* volgens de literatuur (6) geen vitamine B₁ nodig heeft, waren er toch redenen om de invloed van dit vitamine na te gaan.

1. Binnen de grenzen van één soort der phytoflagellaten, waartoe ook *Polytoma uvella* behoort, varieert de opgegeven behoefte aan vitamine B₁ of althans aan thiazool sterk (12). Het ontstaan van een vitamine B₁-behoeftige vorm van *Polytoma uvella* achten wij niet uitgesloten.
2. De vitamine B₁-behoefte zou kunnen variëren in die zin, dat met glycine meer vitamine B₁ nodig is dan wanneer asparagine als voedingsstof gebruikt wordt.
3. Reeds eerder hadden we opgemerkt, dat vitamine B₁, toegevoegd aan een reeds goed groeiende cultuur, de carotenogenese stimuleerde en dus duidelijk ingreep in de fysiologie van *Polytoma uvella*.

Sporen vitamine B₁ schijnen reeds in het medium te kunnen komen, wanneer wattenpluisjes van de steriele afsluiting in het medium vallen (13).

Krebs en Eggleston postuleerden in 1940, dat de primaire functie van vitamine B₁ (als deel van het co-enzym thiamine-pyrophosfaat) is het katalyseren van de Wood-Werkman reactie (14).



In overeenstemming hiermede toonde Smyth een vitamine B₁-sparend effect van oxalo-azijnzuur bij bepaalde bacteriën aan (15).

Nu kunnen asparaginezuur en oxalo-azijnzuur door oxydo-reductieve transaminering in elkaar overgevoerd worden door verschillende organismen (20). We kunnen ons dan ook voorstellen, dat asparagine in ons geval via asparaginezuur en oxalo-azijnzuur de rol van een min of meer specifieke groeifactor vervult naast zijn functie als stikstofleverancier.

1. 5. Vitamine B₁₂ als mogelijke groeifactor

Waar zowel gistwater (9), als asparagine (geïsoleerd uit planten) (16), als een uit de lucht geïnfecteerd medium (vaak *Aspergillaceae*, *Actinomyceten* en sommige coccoïde bacteriën (1)) B₁₂ activiteit kunnen hebben, dachten wij ook aan vitamine B₁₂ als de factor, die in het glycine-medium zou kunnen ontbreken. Verder is van verscheidene phytoflagellaten reeds bekend, dat ze vitamine B₁₂ nodig hebben, of er door gesti-

muleerd worden. Dit geldt o.a. voor een *Chlamydomonas*-stam (17), *Polytoma agilis* (18) en *Euglena gracilis* (19), welke vaak door kleinere concentraties vitamine B₁₂ beïnvloed worden dan de veelal als testorganisme gebruikte *Lactobacillus leichmannii*.

2. Materiaal en methoden

2. 1. Kweektechniek

De groeiproeven werden aanvankelijk verricht met 100 ml medium in 300 ml erlenmeyers (Leerdam's glas) en later met 10 ml medium in 30 ml cultuurbuizen, welke met vette wattenproppen afgesloten werden. Er werd gedurende 20 min. bij 120°C gesteriliseerd in een sterilisator, waarvan de opwarmtijd om van 100°C naar 120°C te gaan, ongeveer 15 minuten bedroeg.

De p_H werd zodanig ingesteld, dat deze na sterilisatie 7,5 werd. De kweektemperatuur was 23° ± 1°C. Het daglicht werd buitengesloten. Om de 7 dagen werden de subcultures gemaakt door te enten met 0,03 ml oude cultuur op 10 ml nieuwe cultuur (resp. 0,25 ml/100 ml).

Van iedere duplo werden 2 subcultures gemaakt. Iedere groeiproef op een bepaald medium werd begonnen door te enten met een goed groeiende cultuur op (0,2% NaAc, 0,4% asparagine, 0,02% K₂HPO₄, 0,01% MgSO₄·7H₂O, 0,02% Na₂CO₃).

Al het glaswerk werd achtereenvolgens met een warme soda-oplossing, verdund HCl, leidingwater en aqua dest. gewassen.

2. 2. Chemicaliën en polarografisch onderzoek

L (+) asparagine werd verkregen van Hoffmann-La Roche, glycine van Brocades, Stheeman en Pharmacia en Na-acetaat (Analar) van Hopkin en Williams.

Het gebruikte gistwater (g. w.) bleek na lyophil drogen 2% vaste stof over te laten.

Voor het verkrijgen van de "asbestanddelen" van asparagine en gist werden respectievelijk 0,5 g en 1 g hiervan verhit in een schuitje, dat zich bevond in een buis van moeilijk smelbaar glas, terwijl een langzame O₂-stroom er overheen geleid werd. De O₂-stroom werd geleid door een wasflesje met 0,1 n HCl (p. a.). De buis en het schuitje werden na de verassing gespoeld met 0,1 n HCl, waarna alle gebruikte HCl-oplossingen samengevoegd en in vacuo ingedampt werden.

Het spore-elementen-mengsel werd gebruikt in de volgende eindconcentraties:

5 mg CaCl_2 , 2 mg Na_3BO_3 , 2 mg ZnCl_2 , 1 mg FeCl_3 , 0,4 mg MnSO_4 , 0,4 mg Na_2MoO_4 , 0,2 mg CuCl_2 en 0,05 mg CoCl_2 per 100 ml cultuurvloeistof (17).

Een polarografisch onderzoek naar metalen in het gebruikte asparagine, glycine en Na-acetaat werd verricht door Dr. D. de Nobel en de Heer J. Heemskerk op het Fysisch-Chemisch Laboratorium der Rijksuniversiteit met een op dit laboratorium gebouwd apparaat 1).

2. 3. Microbiologische vitamine B_{12} -bepaling

Natriumacetaat, glycine en asparagine werden onderzocht met *Lactobacillus leichmannii* A. T. C. C. 313 in een medium van Skegg et al. (21) op vitamine B_{12} -gehalte. Dit onderzoek werd verricht door Dr. B. S. Aussen van het Nederlands Instituut van Volksvoeding (dir.: Prof. Dr. B. C. P. Jansen) te Amsterdam, volgens een door hem uitgewerkte methode (22) 1).

Er werd gevonden 1,37 (1,33) $\text{m}\gamma$ B_{12} /g asparagine voor het praeparaat van Hoffmann-La Roche en 2,06 (2,00) $\text{m}\gamma$ B_{12} /g asparagine voor het B. D. H. product.

3. Resultaten en discussie

3. 1. De invloed van de spore-elementen

Nadat een polarografisch vooronderzoek uitgewezen had, dat het asparagine 10^{-4} à $10^{-6}\%$ Zn bevatte en dat het Na-acetaat en het glycine vrij van Zn waren, werd de invloed van ZnCl_2 op het synthetische medium (0,2% NaAc, 0,2% glycine, 0,02% K_2HPO_4 , 0,01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02% Na_2CO_3) nagegaan in de concentraties 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} en $10^{-3}\%$. Er trad geen verbetering in groei op. De asbestanddelen van asparagine of gistwater, in de corresponderende concentraties toegevoegd aan het Na-acetaat-glycine medium, herstelden evenmin de groei.

Toevoegen van een spore-elementenmengsel, zoals aangegeven door Hutner, Provasoli, Schatz en Haskins (17) gaf enkele dagen na het enten reeds goede groei, die evenwel in de subcultures tot ongeveer de helft terugliep ten opzichte van de eerste geënte cultuur op dit medium.

Voegden wij de, door Hutner e.m. (17) in de protozoölogie geïntroduceerde niet-toxische en niet-consumeerbare com-

1) Wij zijn de Heren Dr. D. de Nobel, J. Heemskerk en Dr. B. S. Aussen zeer erkentelijk voor de door hen verleende medewerking.

plexvormer, aethyleendiaminetetraäijznuur (E. D. T. A.) ook nog toe (0,05%), dan werd de gunstige werking van het spore-elementenmengsel weer te niet gedaan. Waarschijnlijk was de concentratie aan complexvormers (glycine en E. D. T. A.) nu te hoog, waardoor deficiënties kunnen optreden (9, 17).

De verhoudingen liggen hier waarschijnlijk zeer gecompliceerd. Asparagine, getest tot 2%, gaf bij ons, evenals bij Rottier (23), zonder extra spore-elementen toe te voegen, uitstekende groei. De opbrengst aan organismen was met 0,8% NaAc zelfs evenredig aan de N-concentratie. Wij konden deze waarneming van Rottier bevestigen.

Rottier verrichtte geen speciale vergelijkende groeiproeven, zodat niet na te gaan is, of hij met glycine in plaats van asparagine wel goede groei verkregen zou hebben.

Met 2% asparagine is de complexvorming klaarblijkelijk nog niet bezwaarlijk. Vijfmaal omgekristalliseerd asparagine van Hoffmann-La Roche gaf hetzelfde beeld, evenals asparagine van andere fabrieken (B. D. H.).

Merkwaardig was, dat, als we de cultures met glycine als N-bron en met alleen K_2HPO_4 , $MgSO_4$ en Na_2CO_3 als anorganische zouten, na het enten $\pm$ 2 maanden lieten staan, er in verscheidene cultuurbuizen wel goede groei optrad, die enige weken duurde.

Het medium was dus inmiddels geschikt geworden voor het organisme, of door veranderingen in het medium, of door aanpassing van het organisme. Dit namen wij toevallig waar bij de cultures, die $2 \cdot 10^{-6}\%$ folinezuur of p.aminobenzoëzuur bevatten. Ook cultures met $2 \cdot 10^{-6}\%$ vitamine B_{12} of $CoCl_2$ (zie onder 3.2.) vertoonden dit verschijnsel. Van het opsporen van de oorzaak hiervan zagen wij voorlopig af. Eén mogelijkheid is, dat de tijdens het steriliseren geprecipiteerde spore-elementen weer langzaam oplossen.

De groei op het Na-acetaat-glycine-medium werd ook niet verbeterd, als 6 x uit water omgekristalliseerde glycine gebruikt werd.

De slechtere groei met glycine ten opzichte van asparagine werd dus ook niet veroorzaakt door verontreinigingen in het glycine, die eenvoudig te verwijderen zijn, maar waarschijnlijk door het grote verschil in molecuulstructuur van de beide stikstofverbindingen. .

3. 2. De invloed van vitamine B_1

Hier kregen wij geen duidelijk positief of negatief resultaat. Eenmaal vertoonde een cultuur op het medium (0,2% NaAc, 0,2 % glycine, 0,02% K_2HPO_4 , 0,01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,02% Na_2CO_3), waaraan vitamine B_1 ($1\frac{1}{3}$ mg/liter) toegevoegd was, goede groei in tegenstelling met de controle zonder vitamine B_1 . Ook een massacultuur (vergelijk tabel 1, serie 1, in

hoofdstuk I,) op hetzelfde medium, waaraan vitamine B₁ naast CaCl₂ en FeCl₃ voor het steriliseren toegevoegd waren, groeide goed. Dit kan bij de massacultuur echter gelegen hebben aan het veel zwaardere enten met een goed groeiende asparaginecultuur, zodat daar 0,02% asparagine naast 0,2% glycine aanwezig was.

De gunstige werking van vitamine B₁ in het NaAc-glycine medium konden wij bij latere groeiproeven evenwel niet bevestigen.

Het positieve resultaat, dat met vitamine B₁ éénmaal verkregen werd, kan het gevolg van een proeffout geweest zijn.

Samenvattend kunnen we zeggen, dat de rol van vitamine B₁ als groeifactor in het glycinemedium dubieus is. Een verder onderzoek zou vooral ook wegens het theoretische aspect gewenst zijn.

3. 3. Invloed van vitamine B₁₂

Zoals reeds werd vermeld, had een voorafgaand microbiologisch onderzoek uitgewezen, dat noch het Na-acetaat, noch het glycine vitamine B₁₂-activiteit bezat, maar dat dit met het asparagine wel in geringe mate het geval was.

Wij entten *Polytoma uvella* op het glycinemedium, waaraan respectievelijk vitamine B₁₂ en stoffen, die soms vitamine B₁₂ kunnen vervangen (folinezuur, CoCl₂ en p.aminobenzoëzuur) toegevoegd waren in de concentraties 10⁻⁵, 2.10⁻⁵, 10⁻⁴, 2.10⁻⁴ en 2.10⁻³%.

Deze stoffen bleken de groei niet te herstellen.

4. Samenvatting

1. *Polytoma uvella* strain I groeit uitstekend op een synthetisch medium, bestaande uit: 0,2% Na-acetaat, 0,2% asparagine, 0,02% K₂HPO₄, 0,01% MgSO₄.7H₂O, 0,02% Na₂CO₃, zonder extra caramel (in tegenstelling met Pringsheim), CaCl₂ of FeCl₃ (in tegenstelling met Lwoff) toe te voegen.
2. Vervanging van asparagine door glycine kan vermoedelijk slechts plaats hebben, indien een nog verder te onderzoeken spore-elementenmengsel toegevoegd wordt. Het door Hutter et al. voorgestelde mengsel gaf reeds een gedeeltelijk succes.

Literatuur

1. Pringsheim, E. G. ; Pure Culture of Algae, Cambridge Univ. Press (1946).
2. Pringsheim, E. G. ; Planta 26, 665 (1937).

3. Provasoli, L. ; C. R. Soc. Biol. 126, 280 (1937).
4. Lwoff, A., Jonesco, H. ; Biochim. Biophys. Acta 4, 270
en Gutmann, A. ; (1950).
5. Provasoli, A. ; C. R. Soc. Biol. 126, 847 (1937).
6. Hall, R. P. ; Vitamines and Hormones 1, 252
(1943).
7. Hall, R. P. ; Quart. Rev. Biol. 14, 1 (1939).
8. Hall, R. P. ; Hoofdstuk X in G. N. Calkins en
F. M. Summers (red.) Protozoa
in Biological Research. Columbia
Univ. Press, New York (1941).
9. Hutner, S. H. en Provasoli, L. ; Hoofdstuk II in A. Lwoff
(red.) Biochemistry and Physio-
logy of Protozoa I Acad. Press
Inc., New York (1951).
10. Lwoff, A. en Dusi, H. ; Ann. Inst. Pasteur, 67, 230 (1941).
11. Lwoff, A. ; Recherches biochimiques sur la
nutrition des Protozoaires. Mo-
nographie de l'Institut Pasteur.
Paris (1932).
12. Lwoff, A. en Dusi, H. ; Compt. rend. 205, 630, 756 en
882 (1937).
C. R. Soc. Biol. 127, 53 (1938).
13. Schopfer, W. H. en Rytz, W. ; Ark. Mikrobiol. 8, 244 (1937).
14. Krebs, H. A. en Eggleston, L. V. ; Biochem. J. 34 (II), 1383
(1940).
15. Smyth, D. H. ; Biochem. J. 34 (II), 1598 (1950).
16. Robbins, W. J., Hervey, A. en Stebbens, M. E. ; Science 112,
455 (1950).
17. Hutner, S. H., Provasoli, L., Schatz, A. en Haskins, C. P.
Proc. Am. Phil. Soc. 94, 152
(1950).
18. Little, P. A., Oleson, J. J. en Williams, J. H. Proc. Soc.
Exp. Biol. Med. 78, 510 (1951).
19. Hutner, S. H., Provasoli, L., Stokstad, E. L. R., Hoffmann,
C. E., Belt, M., Franklin, A. L. en Jukes, J. H. ; Proc. Soc.
Exp. Biol. Med. 70, 118 (1949).
20. Cammacate, P. S. en Cohen, P. P. ; J. Biol. Chem. 187, 439
(1950).
21. Skeggs, H. R., Nepple, H. M., Valentik, K. A., Huff, J. H.
en Wright, L. D. ; J. Biol. Chem.
184, 211 (1950).
22. Aussen, B. S. ; Dissertatie, Amsterdam (1954).
23. Rottier, P. B. ; C. R. Soc. Biol. 122, 65 (1936).
24. Johnson, J. R. ; Hoofdstuk 25 in H. Gilman (red.)
Organic Chemistry, an Advanced
Treatise II. J. Wiley and Son. Inc.
New York (1943).
25. Schweizer, A. ; Dissertatie Delft (1937).
26. Pringsheim, E. G. ; Naturwissenschaften 41, 380
(1954).

Hoofdstuk IX

DE INVLOED VAN THIAMINE OP DE CAROTENOGENESE IN POLYTOMA UVELLA

1. Inleiding

In hoofdstuk VIII vermeldden we reeds, dat *Polytoma uvella* geen vitaminen nodig heeft voor zijn groei, maar dat toegevoegd thiamine (vitamine B₁) wel de carotenogenese verhoogt. Dit gingen wij quantitatief na (tabel 1).

2. Materiaal en methoden

2. 1. Kweektechniek

De cultures werden gekweekt met 135 ml medium in 300 ml erlenmeyers (Leerdam's glas).

Er werd gedurende 20 minuten bij 120°C gesteriliseerd. De kweektemperatuur was 23°C + 1°C. Het daglicht werd buiten gesloten. In tabel 1 zijn de verdere gegevens vermeld.

2. 2. Bepaling van het totale carotenoiden-gehalte

Voor de bepaling van de hoeveelheden carotenoiden, die vermeld staan in tabel 1, werd 12 dagen na het enten (10 ml asparaginemedium per 125 ml glycine- of ammoniumacetaatmedium) de bovenstaande heldere vloeistof van de betreffende cultures zo veel mogelijk afgezogen. Vervolgens werd de overblijvende suspensie van *Polytoma*'s gedurende 10 minuten met 3000 omw./min. gecentrifugeerd in gecalibreerde buizen van 12 ml.

Na decanteren en aflezen van het volume natte organismen werd met 96% alcohol aangevuld tot 10 ml en het praecipitaat opgeslibd. Na 18 uur staan in een stikstofatmosfeer bij kamertemperatuur werd weer gecentrifugeerd en de maximale extinctie bij 455 mμ, veroorzaakt door de geëxtraheerde carotenoiden in dezelfde alcoholoplossing, gemeten met een Beckmann spectrophotometer (model D. U.). Voor de berekening van de hoeveelheid carotenoiden werd een gemiddelde extinctiecoëfficiënt, gelijk aan die van β-caroteen

$(E)_{1\text{ cm}}^{1\%} = 2500$) aangenomen.

Tabel 1

Carotenoidenproductie in *Polytoma uvella* onder verschillende omstandigheden. Gevarieerd werden het vitamine B₁ gehalte (0 of 1¹/₃ mg./liter), de aard en de concentratie van de stikstofbron en de pH van het medium.

Proefnummer	pH's bij de sterilisatie		samenstelling der media ¹⁾	Opbrengst aan organismen	Opbrengst aan carotenoiden		
	voor	na			in duplo's		omgerekend ge- middelde per Y liter medium
					A Y	B Y	
1	7,0	7,0	0,2% NH ₄ Ac	0,4 à 0,5	1,9	2,5	16
2	"	7,0	0,4 "	0,3 à 0,4	1,8	2,3	15
3	"	6,7	0,8 "	0,4 à 0,5	3,6	0,7	16
4	7,3	7,4	0,2 "	0,4	1,9	2,7	17
5	"	7,2	0,4 "	0,4 à 0,5	1,5	2,3	14
6	"	7,0	0,8 "	0,6 à 0,7	4,4	2,9	27
7	7,6	7,6	0,2 "	0,3	1,5	1,6	11
8	"	7,5	0,4 "	0,7 à 0,8 ³⁾	2,7	5,1	30
9	"	7,1	0,8 "	0,5	4,4	3,4	29
10	7,9	7,5	0,2 "	0,4 à 0,5	1,9	2,1	15
11	"	7,9	0,4 "	0,5 à 0,6	2,1	1,8	15
12	"	8,1	0,8 "	0,4 à 0,5	4,4	1,8	23
13	7,0	7,8	0,2% glycine ²⁾	0,3 à 0,4	6,9	10,0	63
14	7,3	8,0	0,2 "	0,2 à 0,3	9,9	3,4	49
15	7,6	8,2	0,2 "	0,2 à 0,3	8,7	10,5	72
In de onderstaande proefnummers (16 t/m 24) werd vi- tamine B ₁ (1 ¹ / ₃ mg. /liter) voor het enten toegevoegd.							
16	7,0	7,8	0,2% glycine	0,3 à 0,4	21,6	26,0	176
17	7,3	8,0	0,2 "	0,2 à 0,3	19,7	29,4	182
18	7,6	8,2	0,2 "	0,3	26,3	27,9	200
19	7,0	8,0	0,2 "	0,2	23,5	32,6	207
20	7,3	8,2	0,2 "	0,2 à 0,3	26,3	22,7	181
21	7,6	8,4	0,2 "	0,3	22,7	23,3	170
22	7,3	7,4	0,2% NH ₄ Ac	0,4 à 0,5	5,2	9,9	56
23	"	7,4	0,4 "	0,7 à 0,8	11,3	7,1	68
24	"	6,7	0,4 "	0,4	9,2	1,8	40

1) Voor verklaring der voetnoten zie pag. 146.

- 1) Verder werden toegevoegd voor het steriliseren 0,02% K_2HPO_4 ; 0,01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,02% Na_2CO_3 ; 0,001% $CaCl_2$ en 0,0001% $FeCl_3$. Geënt werd met 10 ml van een goed groeiende cultuur op 0,8% Na-acetaat; 2% asparagine; 0,02% K_2HPO_4 ; 0,01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ en 0,02% Na_2CO_3 per 125 ml van het aangegeven medium, zodat ná enten (135 ml totaal volume) ook $\pm 0,1\%$ asparagine en $\pm 0,05\%$ Na-acetaat meer aanwezig zijn.
- 2) Naast 0,2% glycine werd hier 0,2% Na-acetaat (C-bron) en 0,2% glucose toegevoegd.
- 3) Moeilijk scherp af te centrifugeren door een te laag s.g. van de organismen.

3. Resultaten en discussie

Deze proeven werden verricht, voordat we met de in hoofdstuk VIII beschreven groeiproeven begonnen.

Dit verklaart de aanwezigheid van $CaCl_2$, $FeCl_3$ en glucose (zie tabel 1) en de dubbele stikstofbron, nl. 0,1% asparagine, dat steeds op een medium van Na-acetaat en de drie anorganische zouten K_2HPO_4 , $MgSO_4$ en Na_2CO_3 zonder verdere toevoegingen een uitstekende groei gaf, naast 0,2 tot 0,8% van de tweede stikstofbron (NH_4 -acetaat of glycine).

Uit de tabel volgt:

- a. Vitamine B₁ ($1\frac{1}{3}$ mg./liter vóór het enten, $1\frac{1}{4}$ mg./liter ná het enten) verhoogt het carotenoidengehalte in *Polytoma uvella* per liter medium met ongeveer een factor 3 in het volgende medium:
($\pm 0,25\%$ NaAc, 0,2% glycine, 0,2% glucose, $\pm 0,1\%$ asparagine, 0,02% K_2HPO_4 , 0,01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,02% Na_2CO_3 , 0,001% $CaCl_2$ en 0,0001% $FeCl_3$).
- b. Vitamine B₁ heeft dezelfde stimulerende invloed in een medium, dat NH_4 -acetaat in plaats van glycine bevat en overigens gelijk is aan het zojuist genoemde medium. Met $1\frac{1}{4}$ mg. vit. B₁/liter na het enten is de factor weer ongeveer 3. Vergelijk de proefnummers 22, 23 en 24 met 4, 5 en 6 in de tabel.
- c. Vervanging van 0,2% NH_4 -acetaat door 0,2% glycine doet het carotenoidengehalte per liter medium eveneens toenemen, zowel bij afwezigheid van vitamine B₁ (vergelijk 1 t/m 12 met 13 t/m 15), als bij afwezigheid ervan (vergelijk 16 t/m 21 met 22, 23 en 24). De factor is weer ongeveer 3.

De hoeveelheid afgecentrifugeerde *Polytoma*'s is in media met en zonder vitamine B₁ ongeveer gelijk, zodat het vitamine

de opbrengst aan carotenoiden per volume-eenheid *Polytoma*'s verhoogt. Dit is ook visueel zeer goed waar te nemen door het feller gekleurde neerslag van organismen op de vitamine B₁-media.

De merkwaardigerwijze driemaal terugkerende factor 3 is meer een aanduiding van de grootte-orde dan een exacte maat in verband met de spreiding van de gevonden hoeveelheden carotenoiden zoals aangegeven in de laatste kolom. De spreiding is waarschijnlijk o.a. te wijten aan de onvolledige extractie en kleine verschillen in groei ten gevolge van ons onbekende oorzaken, zoals dat bij protozoën nog vaak voorkomt. Het feit van de stimulerende der carotenoidenproductie is echter onmiskenbaar.

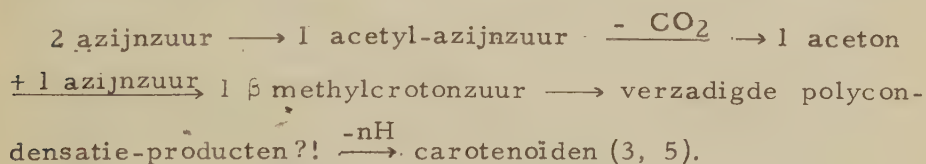
Op grond van niet in de tabel weergegeven experimenten weten wij, dat vitamine B₁ de carotenogenese in *Polytoma*'s, gekweekt op een medium met asparagine als enige stikstofbron, eveneens stimuleert.

Een onderscheid tussen de groep NH₄-acetaat en die met glycine als stikstofbron, dat het praecipitaat van organismen bij de eerste groep steeds slijmerig en bij de laatste groep steeds poederachtig was; in het laatste geval kleefden de organismen bij suspenderen in water niet aan elkaar.

Bij bewaren van de aan het eind van hun groei gekomen cultures daalde het carotenoidengehalte van de bezonken organismen met de tijd (verbleken). *Polytoma*'s, gekweekt op een medium met een hoog asparaginegehalte, verbleekten langzamer dan die, welke gekweekt waren op een lager asparagine-gehalte.

Voor zover ons bekend is, is een stimulerende invloed van vitamine B₁ op de carotenogenese van een organisme, dat voor zijn groei geen vitamine B₁ nodig heeft, nog niet eerder gevonden. Deze stimulering wijst er misschien op, dat carotenoiden mede door decarboxylaties ontstaan. Vergelijk (4).

Dit steunt Bonner's voorzichtige hypothese, dat carotenoiden (bij de plant) via de zelfde voortrap (β methylcrotonzuur) als rubber ontstaan (2).



Ook om deze invloed van thiamine lijkt *Polytoma* uvela ons een geschikt organisme voor de bestudering van de carotenogenese. Voor verdere argumenten raadplege men hoofdstuk V; ook vergelijkbare men in dit verband (6).

Een dergelijke invloed bij een organisme, waarvoor vitamine B₁ tevens reeds een groeifactor is, is wel geconstateerd. Starr en Saperstein vonden nl. onlangs quantitative en kwalitatieve verschillen in de carotenoiden van *Corynebacterium*

poinsettiae, als het gehalte van de *groeifactor* vitamine B₁ in het medium gewijzigd werd (1).

Met het in hoofdstuk V ontwikkelde isoleringsschema zouden bij *Polytoma uvella* eenvoudig kunnen nagaan, hoe de relatieve en absolute hoeveelheden van bijv. voorlopig alleen de vier voornaamste carotenoiden in *Polytoma uvella* veranderen na het toevoegen van thiamine aan het medium.

Enige andere aspecten van de carotenogenese in *Polytoma uvella* worden behandeld in hoofdstuk V.

4. Samenvatting

Thiamine bevordert de carotenogenese in *Polytoma uvella*. Het verschijnsel werd quantitatief nagegaan voor cultures op verschillende media.

(*Polytoma uvella* heeft het genoemde vitamine voor zijn groei niet nodig).

Literatuur

1. Starr, M. P. en Saperstein, S.; Arch. Biochem. Biophys. 43, 157 (1953).
2. Bonner, J. ; Plant Biochemistry. Acad. Press. New York (1950).
3. Bonner, J., Sandoval, A., Tang, Y. W. en Zechmeister, L.; Arch. Biochem. 21, 455 (1949).
4. Jansen, B. C. P. ; Vitamines and Hormones 7, 83 (1949).
5. Rabinowitz, R. L. en Gurian, S.; J. Biol. Chem. 208, 307 (1954).
6. Grob, E. C. en Bütler, R. ; Experientia 11, 259 (1955).

SUMMARY

- I. 1. A theoretical study has been made to find a basic mechanism common to all cases of (phobo-) chemotaxis.

The reason why we restricted ourselves to phobo-chemotaxis, the most frequently occurring form of chemotaxis, is explained.

2. The following conclusion (a) and hypothesis (b) resulted:
 - a. One or a small number of definite, direct points of attack cannot be identified for the chemotactics which are the same in all chemotactic protists.
 - b. The first — or only — common step of the chain processes occurring in the various cases of phobo-chemotaxis (or phobo-phototaxis, phobo-osmotaxis, phobo-thermotaxis) in the shock reaction proper, is according to our hypothesis a sudden — very rapid — decrease in energy supply (energy consumption) in the motor apparatus of the reacting protist. Or stated otherwise:
 - c. Any substance or condition which can suddenly and reversibly increase the quantity (or consumption) of the energy-supplying substance in the motor apparatus can exercise a chemotactic (phototactic, osmotactic, thermotactic, respectively) "attraction" on a phobotactic organism (chemo, photo, osmo, or thermo) in an experimental construction suitable for this purpose. The energy-supplying substance is probably adenosinetriphosphate.
3. In addition an analysis is given of:
 - a. The chemotaxis by oxygen, nutrients, alkali and alkali aearth ions, phosphate ions and narcotics.
 - b. The inhibition of chemotaxis (e.g. induced by substrate substances) by means of narcotics, the motility being maintained.
 - c. Previous investigation into a mechanism of the chemotaxis as well as some recent investigations into the chemotaxis as part of fertilization processes.

- II. 1. Experimental data have been collected to test the hypothesis formed for the phobo-chemotaxis (Chapter I).

Use was made of a second hypothesis resulting from the first: it is probable that several (most?) of the substances which can "attract" a given protist phobo-chemotactically (positive phobo-chemotaxis), can suddenly and reversibly accelerate the metabolism either directly or indirectly (e.g. by increasing the capacity to distribute the energy-supplying material from the metabolic process in the cell). In aerobic organisms an acceleration of the metabolic process will be reflected by a greater oxygen absorption per minute.

2. Chemotaxis and respiration measurements were invariably made on the same suspension of *Polytoma uvella*. A correlation between chemotactic action and immediately increasing oxygen absorption was found for acetic acid, butyric acid (both are good sources of carbon for *Polytoma uvella*), methanol, ethanol, propanol (no sources of carbon) and di-n-amylacetic acid (suitability as a source of carbon unknown).
3. The plant hormone α -naphthylacetic acid and the plant hormone-synergist di-n-amylacetic acid were found to act chemotactically upon *Polytoma uvella* even at very low concentrations.
4. A "dilution effect" was found, visually equal to the "shaking effect" (Chapter III).
5. The experiments of Pringsheim and Mainx (1926) concerning the chemotaxis of *Polytoma uvella* are discussed, partly in connection with our own experiments.
6. Possibilities of further testing our hypothesis for the phobo-chemotaxis are discussed.

- III.
1. It has been found that the respiration of *Polytoma uvella* can be reduced by shaking.
 2. Shaking may result in reversible damage to *Polytoma uvella*. If the damage is not too serious it can under certain conditions be remedied by active processes in the cell, which are sustained by the spare food in the organism. Serious damage probably requires supply of substrate (acetate) from the medium.
 3. A hypothesis on the (phobo-)thigmotaxis has been formed. In the various cases of phobo-thigmotaxis the shock reaction proper is supposed to be preceded by a sudden (very rapid) retardation of the metabolic processes in the organism and therefore/or by a reduction in the supply (or consumption) of the energy-supplying substance in the motor apparatus.

After the shock reaction the metabolism is restored to its former level.

- IV.
- The conditions are described under which *Polytoma uvella* of a well-growing culture could be concentrated and transferred to tap water (or a salt solution) by centrifuging in such a way that the motility of the flagellates was restored after some hours.

- V.
1. The importance of investigations of the carotenoids and of the carotenogenesis in phytoflagellates is discussed.
 2. Mass cultures of the phytoflagellate *Polytoma uvella* were grown on two media and the lipoids formed were isolated.
 3. A quantitative investigation into the separation of caro-

tenoids and steroids of the unsaponifiable fraction showed that unsatisfactory results are obtained by freezing out the steroids and by fractional extraction. Good results were obtained by direct precipitation of the steroids with digitonin. The general applicability of this method is discussed.

4. Two chromatographic micro methods, the disc method for finely divided absorbents and the disc paperchromatography, were modified to some extent and used to gain a rapid impression of the complexity of and the various adsorption affinities in a carotenoid mixture and of the suitability of various adsorbents and eluants for the separation of the mixture.
5. A quantitative investigation of the carotenoids of *Polytoma uvella* showed that the quantities of the carotenes and the xanthophylls correspond with those in Phaeophyceae and Rhodophyceae, while the ratio $\frac{\text{weight xanthophylls}}{\text{weight carotenes}}$ corresponds with that in various other flagellates. No distinct difference in influence on carotenoid production was found between media with vitamin B₁ and with yeast-extract.
6. The carotenoids of *Polytoma uvella* form a complex mixture, in which carotenoids with one broad absorption spectrum form the largest fractions. The principal pigments are: a new epiphasic, weakly acid carotenoid, for which the name of polytomaxanthine is proposed (40-50% of the total quantity), β -carotene (15-20%), a pigment which is probably identical or closely related to myxoxanthine (15-20%) and a hypophasic pigment resembling chrysophlein (7%).
The two first-mentioned carotenoids were obtained in a crystalline form. The physical and chemical properties of these four pigments were determined. The pigments were compared with those of various classes of algae. Besides, eleven other pigments were found in small quantities, one of which was identified with a fair degree of certainty as neo- β -carotene-B, while the others may be decomposition products and/or cis-isomers of the main components.
7. The fact is discussed that *Polytoma uvella* contains the acid keto (?) carotenoid polytomaxanthine instead of as-taxanthine, as found in other phytoflagellates.
8. A survey and a brief discussion of the carotenoids with one absorption spectrum described in the literature are given.
9. In *Polytoma uvella* grown on media with asparagine or ammonium acetate as nitrogen source, some fluorescent substances were found. These substances were not identical to phytoene and phytofluene. They were not found in

the organisms grown on media with glycine as nitrogen source.

10. In connection with the remarkable resemblance in some properties between polytomaxanthine and canthaxanthine the latter pigment was isolated from the mixture of carotenoids of *Cantharellus Cinnabarinus* according to a modified method. Haxo's results were largely confirmed, supplementary data on canthaxanthine, Haxo's "pigment V" and a hypophasic pigment not mentioned by Haxò being obtained from *Cantharellus*.
 11. Adsorbents and eluants are discussed which yielded satisfactory results for the chromatographic analysis of the pigments from *Polytoma uvella* and *Cantharellus Cinnabarinus*. The purification of the solvents used and the calibration and accuracy of the absorption spectra measured are described.
 12. Suggestions are made for a further investigation into the carotenogenesis and the function, if any, of the oxygen-containing carotenoids of *Polytoma uvella*.
- VI. 1. The steroid mixture from *Polytoma uvella* was investigated spectrophotometrically (U. V. and I. R.) and chromatographically. This investigation, as well as some chemical reactions, indicated the presence of a steroid which is closely related to the wellknown provitamins D. Like ergosterol and 7-dehydrostigmaterol it has very probably a double bond in the side chain. The chromatographic investigation suggested that the steroid is not ergosterol.
2. The purity determinations of the provitamin D-like steroid and the melting point determinations revealed the presence also of other lipoids (steroids). These steroids in general did not have a characteristic spectrum and were probably no unsaturated steroids (no Carr and Price reaction).
- VII. The analysis of the higher fatty acids from *Polytoma uvella* is described. The unsaturated fatty acids were determined spectrophotometrically and by means of the iodine addition number. The saturated fatty acids were determined gravimetrically after decomposition of the unsaturated fatty acids. Analysis yielded the following results: the total fatty acids amounted to 11% of the dry weight; the iodine addition number was 130-150; the average molecular weight of the higher fatty acids was 280. Saturated acids amounted to 23-33%, monoenoic acid to 33-40%, dienoic acid to 22-25%, trienoic acid to 10-12% and tetraenoic acid to 11-14% of the total fatty acid mixture. More highly unsaturated acids were practically absent.

- VIII. 1. *Polytoma uvella* (strain I) invariably grew excellently on a synthetic medium consisting of: 0,2% Na acetate, 0,2% asparagine, 0,02% K_2HPO_4 , 0,01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,02% Na_2CO_3 , without adding extra caramel (contrary to Pringsheim), $CaCl_2$ or $FeCl_3$ (contrary to Lwoff).
2. Presumably asparagine can only be replaced by glycine if a mixture of trace elements is added, which still has to be further investigated. The mixture suggested by Hutner et al. was partially successful.

IX Thiamine promotes the carotenogenesis in *Polytoma uvella*.

The phenomenon was quantitatively investigated for cultures on various media. (*Polytoma* does not require this vitamin in its media for its growth).

Mijn academische studie werd in 1940 aan de Universiteit van Amsterdam begonnen. Na in October 1942 het candidaatsexamen te hebben afgelegd, begon ik aan de doctorale studie onder leiding van de Hoogleraren Dr B. C. P. Jansen, Dr J. A. A. Ketelaar, Dr Ir T. Y. Kingma Boltjes, Mevrouw Dr C. H. MacGillavry en Dr J. P. Wibaut. Door oorlogsomstandigheden werd de studie onderbroken van April 1943 tot September 1945. In December 1947 werd het doctoraalexamen te Amsterdam afgelegd. In Januari 1948 werd ik tot assistent op het Organisch Chemisch Laboratorium te Leiden benoemd en begon ik onder leiding van Prof. Dr E. Havinga het in deze dissertatie beschreven onderzoek. In Maart 1950 volgde een benoeming tot hoofdassistent. Van September 1951 tot September 1952 werd het werk onderbroken voor een studiereis naar de Verenigde Staten. Op het Biophysisch Laboratorium van de Universiteit van Pittsburgh (Pennsylvania) werkte ik onder leiding van Prof. Dr M. A. Lauffer aan virusonderzoek en op de „Kerckhoff Laboratories of Biology" van het „California Institute of Technology" te Pasadena onder leiding van de hoogleraren Dr J. Bonner en Dr R. S. Bandurski aan een probleem van de koolhydraatstofwisseling in planten. In September 1952 werd het experimentele werk te Leiden hervat en in April 1953 afgesloten. In deze dissertatie staan de resultaten van het, in Leiden verrichte, werk vermeld.

De familie Carp-Henny te Helmond maakte mijn studie in Amsterdam, te beginnen met het bezoek aan de School voor de Suikerindustrie (October 1939 - Juli 1940), op royale wijze mogelijk. Ik blijf hiervoor zeer erkentelijk.

Het omvangrijke experimentele werk kon verricht worden dank zij de hulp van verschillende studenten en het personeel. Mijn dank gaat allereerst uit naar Drs A. Verloop voor zijn grote steun bij het gehele lipoidenonderzoek. Verder hielpen Mevr. H. W. J. van Gennip-van Rijn, Dra P. Y. F. van der Meulen, Mevr. B. Brouwer-van Straaten, Drs M. P. van Rappoldt en Drs A. P. Zuur bij het kweken van de massacultures en het lipoidenonderzoek. Met Drs M. S. de Groot werd een voorschrift voor de synthese van hogere vetzuren met een oneven aantal koolstofatomen per molecuul uitgewerkt. Mevr. Dra E. Schuyer-Brandenburg en Mevr. H. W. J. van Gennip-van Rijn assisteerden bij de respiratiemetingen. Drs J. N. Leget verzorgde de tekeningen. Incidentele hulp van stafleden en studenten wordt in de tekst vermeld. Het personeel van het laboratorium zorgde er voor, dat het onderzoek steeds vlot kon doorgaan.

De Directie van de Amsterdamsche Chinine Fabriek dank ik voor een toelage gedurende de eerste twee jaar van mijn verblijf in Leiden.

I wish to express my gratitude to the United States Government for the receipt of a grant which covered my stay in the United States and my crossings. The grant became available through the cooperation of the Netherlands-America Institute, the United States Educational Foundation in the Netherlands and the Institute of International Education in New York. I am grateful to the Board of the Hermann Frasch Foundation for additional funds during my stay in California.

De Directie van het Koninklijke/Shell-Laboratorium in Amsterdam betuig ik mijn erkentelijkheid voor de verleende faciliteiten bij de afsluiting van deze dissertatie.

Tenslotte dank ik de heer F. B. Krips en zijn staf voor de goede zorgen aan het drukken van deze dissertatie besteed.

